

Veterinär-Anatomisches Institut  
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich  
Direktor: Prof. Dr. Alois Boos

---

Immunhistochemische Untersuchung zur Verteilung von  
Vitamin D-Rezeptoren im Darm von Kaninchen

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung der Doktorwürde  
an der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von  
Thérèse de Vries de Heekelingen  
Tierärztin aus Zürich ZH

genehmigt auf Antrag von  
Prof. Dr. Alois Boos, Referent  
PD Dr. Annette Liesegang, Korreferentin

Zürich 2008





pour maman

gb

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Abstract	2
3	Einleitung	3
4	Literaturübersicht	5
4.1	Topographie und Morphologie des Darmtraktes beim Kaninchen	5
4.1.1	Anatomie des Darmtraktes	5
4.1.2	Histomorphologische Beschreibung des Darmtraktes	7
4.1.2.1	Tunica mucosa	8
4.1.2.2	Tela submucosa	9
4.1.2.3	Tunica muscularis	10
4.1.2.4	Tunica adventitia	10
4.1.2.5	Tunica serosa	10
4.1.3	Physiologie des Darmtraktes	10
4.1.4	Caecotrophie	11
4.1.5	Volumenverhältnisse der einzelnen Organe des Verdauungssystems	12
4.2	Calcium-Stoffwechsel beim Kaninchen	13
4.2.1	Calcium-Konzentration im Blut	13
4.2.2	Calcium-Ausscheidung über die Nieren	14
4.2.3	Regulation des Calcium-Stoffwechsels	15
4.2.3.1	Parathormon	15
4.2.3.2	Calcitriol	16
4.2.3.3	Calcitonin	16
4.2.4	Calcium-Absorption im Darm	17
4.2.4.1	Transzellulärer Ca-Transport	18
4.2.4.2	Parazellulärer Ca-Transport	19
4.3	Vitamin D	20
4.3.1	Stoffwechsel von Vitamin D	21
4.3.2	Wirkungsmechanismus von Vitamin D	22
4.4	Vitamin D-Rezeptor	23
4.4.1	Lokalisation, Molekulargewicht und Vorkommen	23
4.4.1.1	Lokalisation	23

4.4.1.2 Molekulargewicht	24
4.4.1.3 Vorkommen	24
4.4.2 Struktur und Funktion des Vitamin D-Rezeptors	25
4.4.2.1 Regulierung des Vitamin D-Rezeptors	26
5 Material und Methoden	28
5.1 Versuchstiere	28
5.2 Aufarbeitung des Versuchsmaterials	28
5.3 Immunhistochemischer Nachweis des Vitamin D-Rezeptors	30
5.3.1 Immunhistochemie	30
5.3.1.1 ABC-Methode	30
5.3.2 Immunhistochemische Färbung	31
5.3.2.1 Kontrollen	32
5.4 Auswertung	32
5.5 Statistik	33
6 Resultate	35
6.1 Immunhistologischer Nachweis von Vitamin D-Rezeptoren	35
6.1.1 Histomorphologische Beschreibung	35
6.1.2 Vergleich der vier Gruppen	40
6.1.3 Vergleich der einzelnen Darmabschnitte	42
6.1.4 Vergleich der einzelnen Epithelabschnitte	44
7 Diskussion	51
7.1 Probenmaterial und Auswertung	51
7.2 Nachweis des Vitamin D-Rezeptors	52
8 Literaturverzeichnis	59
9 Anhang	66
Danksagung	
Curriculum Vitae	

## Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Complex
C	Kohlenstoff
Ca	Calcium
CaBP	Calcium-bindendes Protein
CT	Calcitonin
DAB	Diaminobenzidin
DBP	Vitamin D-bindendes Protein
DNS/DNA	Desoxyribonukleinsäure
DrEp	Drüsenepithel
FI	Farbintensität
G	Grasmehl
GG	Gras- und Getreidemehl
IRS	Immunreaktiver Score
kDa	Kilodalton
L	Luzernemehl
I	Liter
LG	Luzerne- und Getreidemehl
M	Molar
mmol	Millimol
mRNS	Messenger RNS
MW	Mittelwert
Na	Natrium
ObEp	Oberflächeneoithel
p	Wahrscheinlichkeit (probability)
P	Phosphor
PTH	Parathormon
RNS	Ribonukleinsäure
STD	Standardabweichung
TR	Thyroidhormon-Rezeptor
UV	Ultraviolett
VDR	Vitamin D-Rezeptor
VDR <sub>mem</sub>	membranständiger VDR
VDR <sub>nuc</sub>	nukleärer VDR
Zn	Zink
µm	Mikrometer



# **1 Zusammenfassung**

Das Ziel dieser Arbeit war es, mittels immunhistochemischer Färbung einen Einblick in das Vorkommen und die Verteilung von Vitamin D-Rezeptoren (VDR) in den verschiedenen Darmabschnitten vom Kaninchen zu erhalten. Zudem wurde der Einfluss der Fütterung auf den VDR-Gehalt untersucht.

24 fünf bis sechs Monate alte Kaninchen der Rasse New Zealand White Rabbit wurden in vier Gruppen zu sechs Tieren aufgeteilt und mit vier verschiedenen Futtermitteln gefüttert: Gruppe L mit Luzernemehl, Gruppe G mit Grasmehl, Gruppe LG mit Luzerne- und Getreidemehl, Gruppe GG mit Gras- und Getreidemehl.

Für die VDR-Bestimmung wurden von jedem Tier jeweils Proben aus fünf verschiedenen Darmabschnitten entnommen – Duodenum, Jejunum, Ileum, Caecum und Colon.

Die VDR wurden in den Zellkernen der Enterozyten immunhistochemisch in allen Versuchsgruppen und sämtlicher untersuchter Darmabschnitte nachgewiesen.

Die grösste Menge an VDR konnte im Caecum beobachtet werden. Sie war etwa 1,5-mal höher als im Duodenum. Im Dünndarm nahm die Menge VDR von proximal nach distal ab. Im Ileum und im Colon waren am wenigsten VDR vorhanden.

Mit Ausnahme des Colons wies das Drüsenepithel in allen Darmabschnitten eine signifikant stärkere Immunreaktion auf als das Oberflächenepithel.

Ausser im Caecum der Gruppe LG konnte kein direkter Zusammenhang zwischen (i) dem VDR-Gehalt in den Darmabschnitten Duodenum, Jejunum, Ileum und Colon und (ii) dem Calciumgehalt im Futter in vorliegender Studie hergestellt werden.

## 2 Abstract

The objective of this study is to detect Vitamin D receptors (VDR) in the different parts of the intestine of rabbits using immunohistochemical methods. The ancillary role of the nutrition on the VDR-amount was analyzed concurrently.

Twenty-four (24) five to six month old New Zealand White Rabbits were divided in four (4) separate control groups of six (6) animals each and fed as follows:

- Group L with alfalfa-flour
- Group G with grass-flour
- Group LG with alfalfa and cereal-flour
- Group GG with grass and cereal-flour

The immunohistochemical detection of VDR was done on samples of five different compartments of the intestine – duodenum, jejunum, ileum, caecum and colon. VDR in the nuclei of enterocytes was found in all of the groups and in all of the intestine compartments.

The highest concentration of VDR in the nuclei of enterocytes was found in the caecum – which was 1,5 times higher than the concentration found in the duodenum. The small intestine showed a decreased concentration from proximal to distal. The ileum and the colon showed the fewest immunohistochemical reactions with VDR.

With the exception of the colon, VDR-concentration was higher in the glandular epithelia than in the surface epithelia.

There was – with the exception of the caecum of Group LG – no observable direct correlation between (i) the concentration of VDR in the nuclei of enterocytes in the intestine compartments; and (ii) the concentration of Calcium of the food given to each control group.



### **3 Einleitung**

Kaninchen verfügen über einen aussergewöhnlichen Calciumstoffwechsel. Ihr Serumcalciumgehalt ist um 30–50 % höher und wird in weniger engen Grenzen gehalten als bei anderen Säugetieren (Buss und Bourdeau, 1984).

Die intestinale Calciumaufnahme bei Säugetieren ist abhängig vom Calciumbedarf des Organismus sowie vom Calciumgehalt in der Nahrung. Sie erfolgt entweder über die passive, parazelluläre Diffusion oder über den Vitamin D-abhängigen, aktiven, transzellulären Weg (Bronner, 1987). Die parazelluläre Absorption zieht sich über die gesamte Länge des Darmtraktes hin, während die transzelluläre Calciumaufnahme bei den meisten Säugetieren vorwiegend in den proximalen Dünndarmabschnitten und nur in einem kleinen Umfang im Dickdarm stattfindet (Bronner, 1987). Bei der transzellulären Calciumabsorption bindet das Calcitriol – die biologisch aktive Form des Vitamin D, auch Vitamin D-Hormon genannt – an den Vitamin D-Rezeptor (VDR). Der so entstandene Hormon-Rezeptor-Komplex wirkt als Transkriptionsfaktor und steuert in der Darmschleimhaut die Synthese der für die aktive Ca-Absorption benötigten Transportproteine (Dusso et al., 2005).

Bei Kaninchen ist die passive, parazelluläre Diffusion sehr effizient. Dieser Absorptionsmechanismus ist nicht an einen Feedback-Mechanismus gekoppelt, weshalb eine direkte Korrelation zwischen der Calciumaufnahme und dem Calciumgehalt in der Nahrung besteht (Chapin und Smith, 1967; Cheeke und Amberg, 1973). Den transzellulären Weg der Calciumaufnahme nutzen Kaninchen erst bei einer Mangelversorgung mit dem Mineralstoff (Kamphues, 1991; Redrobe, 2002).

Kaninchen gehören, ähnlich den Pferden, aufgrund ihrer Verdauungsphysiologie zu den Dickdarmverdauern (Soave und Brand, 1991). Bei den Kaninchen laufen die Fermentationsvorgänge hauptsächlich im Caecum ab, woraus sich für diese Tiere der Begriff Caecumverdauung ergibt, im Gegensatz zu den Pferden, die zu den Colonverdauern gehören (Breves et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde das Vorkommen der VDR im Darm von Kaninchen untersucht. Frühere Studien bei Säugetieren ergaben, dass die Vitamin D-abhängige, transzelluläre Calciumabsorption im Darm hauptsächlich in den

proximalen Dünndarmabschnitten, kaum aber in den distalen Darmabschnitten erfolgt (Bronner, 1987; Kaune, 1999; Schröder und Breves, 2006).

Die genaue Lokalisation der transzellulären, Vitamin D-abhängigen Ca-Absorption in den verschiedenen Darmabschnitten von Kaninchen wurde bislang nicht untersucht. Studien über den transzellulären Ionentransport – v. a. Natrium-, Kalium- sowie Chloridionen – im Dickdarm von Kaninchen (Sellin und DeSoignie, 1984; Clauss et al., 1989) weisen allerdings auf eine beachtliche transepitheliale Ionenabsorptionsaktivität im proximalen Colon bzw. im Caecum hin.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Zusammenhänge zwischen der Verdauungsphysiologie und dem intestinalen Verteilungsmuster der VDR von Dickdarmverdauern am Beispiel des Kaninchens zu überprüfen.

Die für die vorliegende Studie verwendeten Darmproben stammten von 24 fünf Monate alten Kaninchen der Rasse New Zealand White Rabbit. Die Versuchstiere wurden in vier Fütterungsgruppen – Gruppe L, G, LG und GG – gemischten Geschlechts eingeteilt. Die vier für den Versuch verwendeten Futtermittel – Luzerne, Gras, Luzerne und Getreide sowie Grasmehl und Getreide – enthielten unterschiedliche Calcium- und Phosphorgehalte. Für die immunhistochemische Färbung wurden von jedem Tier jeweils fünf verschiedene Darmabschnitte entnommen – Duodenum, Jejunum, Ileum, Caecum und Colon – und auf das Vorkommen und die Verteilung der VDR sowie auf den Einfluss des Calciums der Fütterung auf diesen Parameter hin untersucht.

## **4 Literaturübersicht**

### **4.1 Topographie und Morphologie des Darmtraktes beim Kaninchen**

#### **4.1.1 Anatomie des Darmtraktes**

Als Pflanzenfresser verfügt das Kaninchen über einen verhältnismässig langen Verdauungstrakt, der mit einer Gesamtlänge von 4,0 bis 6,5 Metern die Körperlänge um beinahe das Zehnfache übertrifft (Abb. 1) (Schley, 1985).

Generell wird im Darmkanal der Säugetiere der Dünndarm (Intestinum tenue) vom Dickdarm (Intestinum crassum) unterschieden (Salomon, 2005). Der Dünndarm wiederum gliedert sich in drei Abschnitte, den Zwölffingerdarm (Duodenum), den Leerdarm (Jejunum) und den Hüft darm (Ileum).

Das Duodenum des Kaninchens bildet eine lang gezogene, nach kaudal gerichtete Schleife und befindet sich im linken dorsalen Teil der Bauchhöhle. Dem Duodenum mit seinen Partes craniales, descendens, transversae und ascendentes duodeni, schliessen sich das an einem langen Gekröse befestigte, im linken dorsalen Teil des Bauchraumes befindende Jejunum an. Das letzte Segment des Dünndarms bildet das – im Vergleich zu anderen Tierarten – relativ lange Ileum. Es verläuft zwischen Colon ascendens und Caecum und mündet nach einer deutlichen Erweiterung (Sacculus rotundus) (Abb. 1 und 2) zapfenartig in den Blinddarmkopf (Schulze, 2005).

Der Dickdarm lässt sich in den Blinddarm (Caecum), Grimmdarm (Colon) und Mastdarm (Rectum) gliedern und stellt beim Kaninchen eine grosse Gärkammer dar. Das sehr grosse Caecum nimmt bis zu einem Drittel des gesamten Bauchraumes ein und liegt fast der gesamten ventralen Bauchwand an (Isenbügel und Frank, 1985). In seiner Gesamtheit bildet der Blinddarm eine Spirale mit zentral liegendem Caecumkopf (Abb. 2) und verfügt über 40 bis 45% des Fassungsvermögens der gesamten Verdauungsorgane (Schlölaut, 2003). Er überragt die Kapazität des Magens um das 8- bis 12fache (Schulze, 2005). Neben dem Kopf (Basis caeci), dem Körper (Corpus caeci) und der Spitze (Apex caeci) ist am Blinddarm von Hasen und Kaninchen ein 10 bis 15 cm langer Wurmfortsatz (Appendix vermiformis) ausgebildet (Schulze, 2005).

Das der Basis caeci entspringende Colon hat ein dem Dünndarm vergleichbar geringes Lumen. Nach einer Aufweitung (Ampulla coli) folgt dem gewundenen Colon ascendens das kurze Colon transversum. Das sich anschliessende Colon descendens kommt mit den Jejunumschlingen im linken dorsalen Raum der Bauchhöhle zu liegen (Schulze, 2005). Als letztes Teilstück des Darmkanals schliesst sich dem Colon descendens das Rectum an.

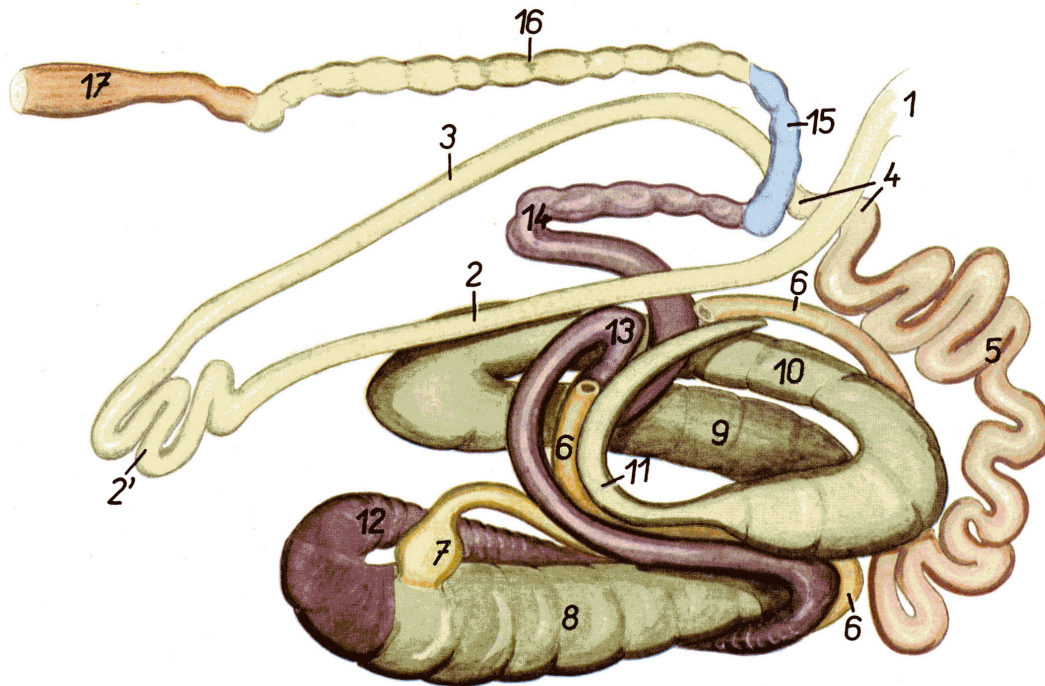


Abb. 1: Darmtrakt des Kaninchens, halbschematische Ansicht von rechts (Popesko, 1989)  
 1 Pylorus (Magenpförtner); 2 Pars descendens duodeni; 2' Pars transversa duodeni; 3 Pars ascendens duodeni; 4 Flexura duodenojejunalis;  
 4-5 Jejunum; 6 Ileum; 7 Sacculus rotundus; 8-11 Caecum; 8 Basis caeci (1. Blinddarmwindung); 9 Corpus caeci (2. Blinddarmwindung); 10 Apex caeci (3. Blinddarmwindung); 11 Appendix vermiformis; 12-14 Colon ascendens; 15 Colon transversum; 16 Colon descendens; 17 Rectum

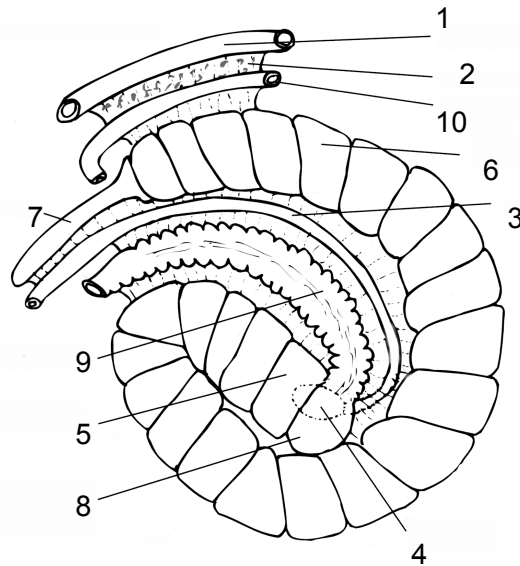


Abb. 2: Topographische Lage des spiralförmigen Blinddarmes beim Kaninchen (modifiziert nach Harcourt-Brown, 2002)  
1 Duodenum (Pars descendens); 2 Pankreas; 3 Ileum; 4 Sacculus rotundus; 5 Basis caeci; 6 Corpus Caeci; 7 Appendix vermiformis; 8 Ampulla coli; 9 Colon ascendens; 10 Colon descendens

#### 4.1.2 Histomorphologische Beschreibung des Darmtraktes

Der Darmkanal ist nach einem einheitlichen Prinzip aufgebaut. Er setzt sich aus der Schleimhaut (Tunica mucosa), der Unterschleimhaut (Tela submucosa), der Muskulatur (Tunica muscularis), der Bindegewebsschicht (Tunica adventitia oder Tela subserosa) und der Serosaschicht (Tunica serosa) zusammen (Abb. 3; Tab. 1) (Weyrauch et al., 1998).

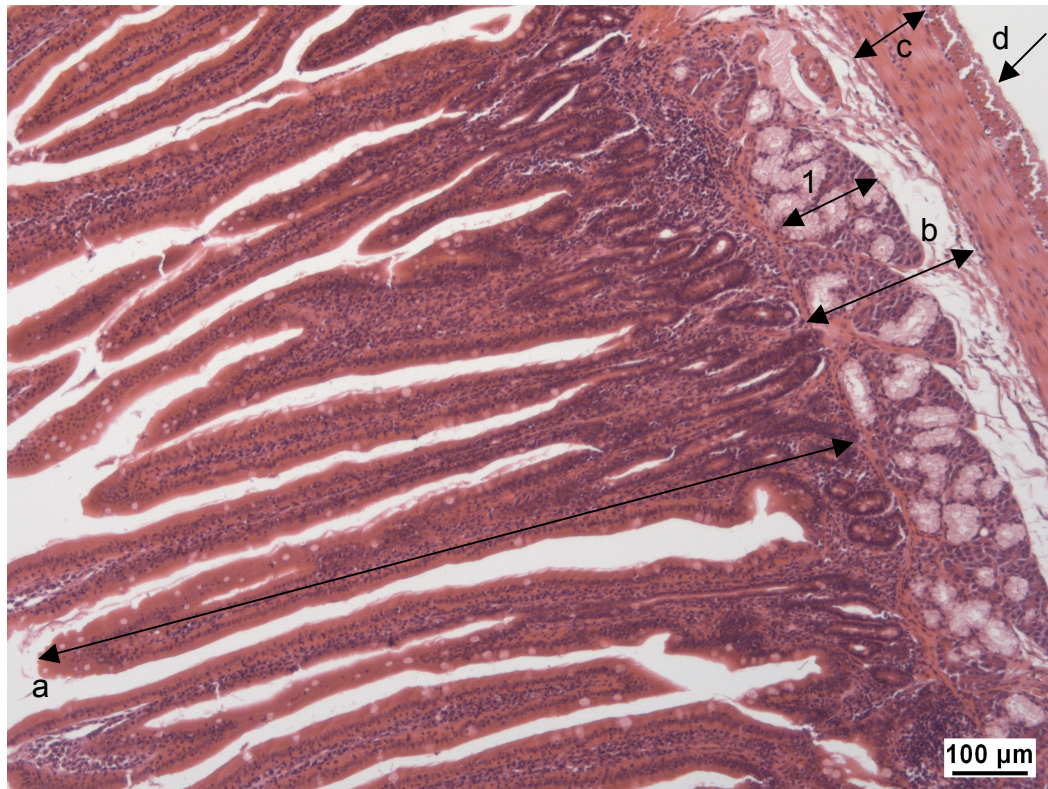


Abb. 3: Aufbau der Darmschleimhaut (Duodenum)  
a Tunica mucosa; b Tela submucosa; c Tunica muscularis; d Tunica adventitia/Tunica serosa; 1 Brunner-Drüsen

Tabelle 1: Unterteilung der einzelnen Wandschichten des Darmkanals

Tunica mucosa	Lamina epithelialis mucosae Lamina propria mucosae Lamina muscularis mucosae
Tela submucosa	
Tunica muscularis	Stratum circulare Stratum longitudinale
Tunica adventitia Oder Tunica serosa	Lamina propria serosae Lamina epithelialis serosae

#### 4.1.2.1 Tunica mucosa

Die Tunica mucosa ist aus drei Schichten aufgebaut. Die innerste Schicht, die Lamina epithelialis mucosae, bildet das Schleimhautepithel des Darmkanals und

besteht – mit Ausnahme des Anus mit einem mehrschichtigen Plattenepithel – aus einem einschichtig-hochprismatischen Epithel (Mosimann und Kohler, 1990) mit zwei Arten von Zellen. Dies sind einerseits die Saumzellen (Epitheliocyti columnares) mit einem lumenseitigen Bürstensaum aus Mikrovilli, der die Zelloberfläche um etwa das Dreissigfache vergrößert, andererseits die Becherzellen (Exocrinocyti caliciformes), monozelluläre Drüsenzellen, die Schleimgranula im Zellleib ansammeln und an die Oberfläche sezernieren (Mosimann und Kohler, 1990). Ihre Anzahl nimmt vom Dünndarm zum Dickdarm hin stetig zu und sie sind im Dickdarm die vorherrschenden Epithelzellen der tubulösen Dickdarmdrüsen (Glandulae intestinales, Cryptae).

Der Lamina epithelialis mucosae liegt die aus lockerem Bindegewebe bestehende Lamina propria mucosae an. Neben den Blut- und Lymphgefässen, Nervenfasergeflechten und Abwehrzellen (Liebich, 2003) befinden sich in dieser subepithelialen Schicht die für den jeweiligen Darmabschnitt typischen Drüsen (Propriadrüsen) (Mosimann und Kohler, 1990).

Die dritte Schicht der Tunica mucosa, die aus glatten Muskelzellen bestehende Lamina muscularis mucosae, trennt die Schleimhaut von der Submucosa ab.

Die Dünndarmschleimhaut erfährt durch zirkulär verlaufende Schleimhautfalten (Pilcae circulares) und durch etwa 1 mm lange und etwa 0,1 mm dicke Darmzotten (Villi intestinales) (Weyrauch et al., 1998) eine Oberflächenvergrößerung um mehr als 50 % (Mosimann und Kohler, 1990), die zu einer möglichst effizienten Resorptionsaktivität beiträgt. Im Jejunum sind die Zotten länger, schlanker und weniger dicht als im Duodenum. Die Ileumschleimhaut weist deutlich weniger Falten auf und die Zotten sind hier auch kürzer, breiter und weniger dicht als im vorhergehenden Jejunum. Im Dickdarm fehlen die Darmzotten. Ausser den in Längsrichtung verlaufenden, sich aus der Tela submucosa vorstülpenden Falten, ist die innere Oberfläche weitgehend glatt (Liebich, 2003).

#### 4.1.2.2 Tela submucosa

Die Unterschleimhaut (Tela submucosa) aus lockerem Bindegewebe grenzt an die Schleimhaut (Tunica mucosa) (Mosimann und Kohler, 1990). Einzellymphknötchen (Noduli lymphatici solitarii) und – vorwiegend im Ileum und im Caecum – aggregierte Lymphknötchen (Noduli lymphatici agregati, Peyer-Platten) häufen sich stellenweise in der intestinalen Unterschleimhaut (Liebich, 2003).



Die in der Tela submucosa vorliegenden, meist verzweigten tubuloazinären Duodenaldrüsen (Glandulae submucosae, Brunner-Drüsen) sind ein typisches Erkennungsmerkmal dieses Darmabschnittes (Abb. 12). Sie erstrecken sich im Anfangsbereich des Duodenum, je nach Tierart, über eine Spanne von einigen Zentimetern bei Hunden und kleinen Wiederkäuern und von mehreren Metern (4-6 m) bei Wiederkäuern, Schweinen und Pferden (Liebich, 2003).

#### 4.1.2.3 Tunica muscularis

Die Muskelschicht (Tunica muscularis) im Darmkanal ist zweischichtig – eine innere Zirkulär- und eine äussere Längsschicht (Stratum circulare bzw. Stratum longitudinale) – und besteht aus glatter Muskulatur (Liebich, 2003).

#### 4.1.2.4 Tunica adventitia

Im caudalen Beckenbereich sind die Darmabschnitte über die Tunica adventitia mit den anliegenden Geweben verbunden. Wie bereits die Lamina propria mucosae und die Tela submucosa besteht auch die Tunica adventitia aus lockerem Bindegewebe, in welchem, neben mehr oder weniger viel vorhandenem Fettgewebe, die Versorgungssysteme der betreffenden Darmabschnitte verlaufen (Liebich, 2003).

#### 4.1.2.5 Tunica serosa

In der Bauch- und den cranialen Abschnitten der Beckenhöhle ist der Darm von der zweischichtigen Tunica serosa überzogen. Dem einschichtigen Plattenepithel (Lamina epithelialis serosae) liegt eine Schicht lockeren Bindegewebes (Lamina propria serosae) an. Die Lamina epithelialis serosae gewährleistet einerseits wegen ihrer glatten Oberfläche die Verschieblichkeit der Verdauungsorgane (Mosimann und Kohler, 1990), dient andererseits der Stoffaufnahme aus den Körperhöhlen durch Pinzytose und Phagozytose und kann gleichzeitig seröse Flüssigkeit sezernieren (Liebich, 2003).

### 4.1.3 Physiologie des Darmtraktes

In den drei Abschnitten des Dünndarmes wird die im Magen vorverdaute Nahrung durch Verdauungssekrete aus der Darmschleimhaut, der Bauchspeicheldrüse (Pankreas) und der Galle mittels enzymatischer Spaltung in ihre Einzelbausteine zerlegt (Schlölaut, 2003). Proteine, Fette und Kohlenhydrate werden zu



Aminosäuren, Fettsäuren und Monosacchariden abgebaut und neben Wasser, Elektrolyten und Vitaminen von der Schleimhaut resorbiert (Scharrer, 2000).

Der aus dem Dünndarm übergetretene Chymus wird durch die stark ausgeprägte Wasserrückresorptionsfähigkeit des Dickdarms eingedickt. Der von den Becherzellen sezernierte Schleim sorgt für die notwendige Gleitfähigkeit (Breves et al., 2000).

Vergleichbar mit anderen Säugetieren ist das Caecum des Kaninchens für den mikrobiellen Abbau der Rohfasern verantwortlich (Schlolaut, 2003). Dabei wird die Zellulose vorwiegend durch hydrolytische Spaltung verdaut. Ähnlich der Vorgänge in den Vormägen von Wiederkäuern, entstehen auf diese Weise Fettsäuren, die über die Schleimhaut resorbiert werden (Breves et al., 2000).

#### **4.1.4 Caecotrophie**

Die Caecotrophie ist eine Spezialform der Koprophagie beim Kaninchen. Dabei werden im Caecum gebildete, weiche, traubenartig aneinander gereihte Kotkugeln gefressen (Schley, 1985). Dieser Blinddarmkot dient sowohl der Bedarfsdeckung an Vitaminen B und K wie auch der besseren Nutzung der Nährstoffe (Isenbügler und Frank, 1985; Schlolaut, 2003). Durch kontinuierliche, schwache Antiperistaltik im proximalen Colon werden Mikroorganismen und Wasser zurück in das Caecum transportiert (Björnhag, 1994). Der breiige Blinddarminhalt (Caecotrophe) gelangt anschliessend, geschützt in einer Schleimhülle, etwa einmal täglich durch schnelle Peristaltik zum Rektum. Die Aufnahme dieser protein-, mineralstoff- und fettsäurehaltigen Caecotrophe erfolgt direkt vom Anus (Björnhag, 1994; Schlolaut, 2003). Nach einer Zwischenlagerung im Magen (Abb. 4) wird die Caecotrophe im Dünndarm verdaut und die Nährstoffe werden resorbiert (Björnhag, 1994; Breves et al., 2000).

Neben Kaninchen nutzen auch Meerschweinchen, Chinchillas, Ratten, Hamster und zum Teil auch Fohlen (Soave und Brand, 1991) die Koprophagie zur besseren Verwertung der im Dickdarm nicht verdauten oder durch Bakterien produzierten Nährstoffe. Eine Unterdrückung dieses Vorganges kann zu Entwicklungsstörungen und Unterernährung führen (Soave und Brand, 1991).

Die bakterielle Fermentation im Dickdarm der nicht-wiederkauenden, Pflanzen fressenden Spezies entspricht den Vorgängen im Pansen der Wiederkäuer.

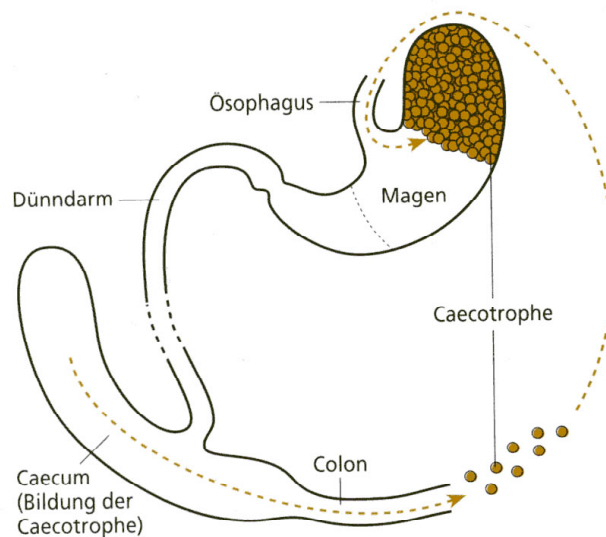


Abb. 4: Bildung der Caecotrophe und deren Zwischenlagerung im Magen (Breves et al., 2000; modifiziert nach Harder, 1950)

#### 4.1.5 Volumenverhältnis der einzelnen Organe des Verdauungsystems

Eine Besonderheit des Verdauungsapparates des Kaninchens stellt das verhältnismässig grosse Volumen des Magens und des Blinddarms dar. Tabelle 2 veranschaulicht die tierartlichen Unterschiede des relativen Fassungsvermögens einzelner Verdauungskanalabschnitte, ausgedrückt in Prozent des Gesamtvolumens. Das Kaninchen verfügt im Vergleich zu den anderen Säugetieren über die grösste relative Magengrösse. Diese kann jedoch nicht mit derjenigen des Rindes verglichen werden, da sich der Magen bei Wiederkäuern aus den drei Vormägen und dem Labmagen zusammensetzt. Interessant ist die unterschiedliche Volumenverteilung zwischen den Dickdarmverdauern Kaninchen und Pferd. Der mikrobielle Nährstoffabbau erfolgt beim Kaninchen, wie oben erwähnt, hauptsächlich im Blinddarm, wohingegen beim Pferd das Colon die wesentliche Gärkammer mit dem grössten Fassungsvermögen bildet (Breves et al., 2000). Für eine genauere Einteilung der Dickdarmverdauung werden auch die Begriffe Caecumverdauung – für Kaninchen, Meerschweinchen, Hamster, Chinchillas und weitere – sowie Colonverdauung – unter anderem für Pferde, Nashörner, Schildkröten, Schweine und diverse Affenarten – verwendet (Breves et al., 2000; Liesegang et al., 2007).

Tabelle 2: Relatives Fassungsvermögen einzelner Verdauungstraktabschnitte bei verschiedenen Tierarten (in % des Gesamtvolumens; modifiziert nach Schley, 1985)

Verdauungstraktabschnitt	Kaninchen	Pferd	Rind	Schwein
Magen	<b>34</b>	9	70	29
Dünndarm	11	30	19	33
Blinddarm	<b>49</b>	16	3	6
Grimmdarm (Colon)	6	45	8	32

## 4.2 Calciumstoffwechsel beim Kaninchen

Calcium (Ca) ist ein Mengenelement, von dem eine Vielzahl lebenswichtiger biologischer Körperfunktionen abhängen, wie beispielsweise die Beteiligung an dem Muskelstoffwechsel, der Enzymaktivierung, der Blutgerinnung oder der präsynaptischen Ausschüttung von Neurotransmittern. 99 % des Calciums (Krück, 1988) befinden sich in den Knochen und den Zähnen während nur etwa 1 % im Weichgewebe (Kaune, 1999) anzutreffen ist. Im Serum ist Calcium in drei Formen vorzufinden. Das ionisierte Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) stellt die biologisch wirksame Form dar. Sein Anteil ist vom pH-Wert des Blutes abhängig. Bei einem tiefen pH ist der Gehalt an freien Ca-Ionen im Blut erhöht. Ferner ist Calcium an Proteine (v. a. Albumine, bis zu 40 %) oder an organische Säuren (etwa 5 %) gebunden (Kraft et al., 2005).

### 4.2.1 Calcium-Konzentration im Blut

Bei Kaninchen liegt die Ca-Konzentration im Blut aus noch nicht geklärten Gründen 30-50 % höher und wird in weniger engen Grenzen gehalten als bei anderen Säugetieren (Harcourt-Brown, 2002). Sie hängt vom Alter und vom Reproduktionsstatus des Tieres ab. So konnten Warren et al. (1989) im Blut  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen von  $1,70 \pm 0,13$  mmol/l und Gesamtcalcium-Konzentrationen von  $3,23 \pm 0,25$  mmol/l messen. In einem Experiment von Chapin und Smith (1967) wurden nach einer Ca-reichen Fütterung sehr hohe totale Blut-Ca-Werte von 5,42 mmol/l gemessen. Eine Ca-Konzentration im Blut von Kaninchen im Bereich zwischen 3,0-4,2 mmol/l kann somit, angesichts der unterschiedlichen publizierten Referenzbereiche, bei ausgeglichener Fütterung als normal erachtet werden (Harcourt-Brown, 2002). Eine Zunahme der Plasma-Ca-Konzentration nach erhöhter

Ca-Zufuhr wurde nur bei adulten Kaninchen gemessen, nicht aber bei Jungtieren, die einen konstanten Plasma-Ca-Wert von etwa 3,5 mmol/l aufzeigen (Glisanz et al., 1991; Harcourt-Brown, 2002; Eckermann-Ross, 2008).

Bei Pferden, die über einen mit Kaninchen vergleichbaren Calciumstoffwechsel verfügen, wurden in einer Studie von Berlin und Aroch (2008) Serum-Ca-Werte zwischen 2,72-3,53 mmol/l gemessen.

Die Serum-Ca-Werte anderer Säugetiere liegen im Schnitt bei etwa 2,5 mmol/l (Hoenderop et al., 2005) und sind damit deutlich niedriger als beim Kaninchen. Bei der Kuh liegen die Werte zwischen 2,3-2,8 mmol/l, bei Hund und Katze im Bereich von 2,3-3,0 mmol/l (Kraft et al., 2005).

#### **4.2.2 Calcium-Ausscheidung über die Nieren**

Eine Besonderheit beim Kaninchen, wie auch bei weiteren Dickdarmverdauern – unter anderem Pferd, Meerschweinchen, Chinchilla, Hamster – ist die hohe Ca-Ausscheidungsrate über die Nieren, die im Zusammenhang mit einem hohen Ca-Gehalt im Futter und einem erhöhten Blut-Ca-Spiegel steht.

Bei zunehmender Ca-Aufnahme über die Nahrung nimmt die Ca-Resorption im Darm zu, die zu einer erhöhten Serum-Ca-Konzentration führt. Als Folge kommt es bei Dickdarmverdauern zu einer erhöhten renalen Ca-Ausscheidung (Harcourt-Brown, 2002; Eckermann-Ross, 2008). Es ist anzunehmen, dass die passive Diffusion im Darm einen effizienten Resorptionsweg für Calcium darstellt. Dieser ist nicht an einen Feedback-Mechanismus gekoppelt, sondern vom Ca-Gehalt in der Nahrung abhängig (Cheeke und Amberg, 1973). Um einer Hypercalcämie entgegenzuwirken, wird durch eine zunehmende Ca-Konzentration im Blut bei Dickdarmverdauern die Ca-Sekretion über die Nieren gesteigert. Die Harnmenge nimmt dabei nicht zu, so dass bei einem konstanten Harnvolumen, die Ca-Konzentration sehr stark zunehmen kann. Die erhöhte Ca-Menge im Urin und der bei Pflanzenfressern übliche alkalische Harn-pH – bei Kaninchen etwa 8,2 (Hrapkiewicz et al., 1998) – können zu einer Ausfällung von Ca-Carbonat- oder Ca-Oxalatkristallen führen. Diese lassen sich – bei Kaninchen besonders deutlich – an der typischen Trübung des Harns erkennen (Kamphues et al., 1985; Schley, 1985). Bei einer sehr starken Kristallausfällung im Harn entstehen klinische Symptome (Urolithiasis) (Isenbügel und Frank, 1985; Eckermann-Ross, 2008).

Cheeke und Amberg (1973) beobachteten bei einer identischen Fütterung mit hohen Ca-Gehalten, eine unterschiedliche Ca-Ausscheidung bei Ratte und Kaninchen. Der wichtigste Ausscheidungsweg überschüssigen Calciums bei der Ratte sowie bei den übrigen Nicht-Dickdarmverdauern ist der Darm, beim Kaninchen hingegen sind es die Nieren. So wurde im Harn bei letzterem bis zu 60 % des mit der Nahrung aufgenommenen Calciums ausgeschieden. Im Urin der Ratten konnten dagegen nur etwa 2 % des mit der Nahrung aufgenommenen Calciums nachgewiesen werden.

### **4.2.3 Regulation des Calcium-Stoffwechsels**

Der Ca-Haushalt umfasst die bedarfsabhängigen Wechselwirkungen zwischen intestinaler Absorption, renaler Sekretion bzw. Reabsorption und Mobilisation aus sowie Einbau in den Knochen.

Zu den drei wichtigsten, den Ca-Stoffwechsel beeinflussenden Hormonen, zählen das Parathormon (PTH) aus den Hauptzellen der Nebenschilddrüse, das mit der Nahrung aufgenommene oder durch den Organismus selbst synthetisierte Calcitriol (1,25-dihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub>, Vitamin D-Hormon) und das Calcitonin (CT) aus den parafollikulären (C-)Zellen der Schilddrüse. Geschlechtshormone, Kortikosteroide, Thyroxin, Somatotropin und Glukagon sind weitere Hormone, die in den Ca-Stoffwechsel eingreifen (Kraft et al., 2005).

#### **4.2.3.1 Parathormon (PTH)**

PTH ist ein Peptidhormon, das als Regulator für die extrazelluläre Ca-Konzentration fungiert. Bei einem Abfall der Plasma-Ca-Konzentration wird PTH aus der Nebenschilddrüse freigesetzt. Durch die Steigerung der Ca-Absorption in der Dünndarmschleimhaut, die Mobilisation von Calcium (und Phosphat) aus den Knochen anhand der Aktivierung der Osteoklasten, die Zunahme der tubulären Ca-Rückresorption mit gekoppeltem Anstieg der P-Ausschüttung in der Niere sowie durch die gesteigerte renale Calcitriol-Synthese (siehe dazu Kapitel 4.3.1) wird durch PTH der Blut-Ca-Wert wieder normalisiert. Bereits eine nachfolgende minime Zunahme der Plasma-Ca-Konzentration wirkt sich wiederum in einer negativen Rückkopplung auf die PTH-Sekretion aus.

#### 4.2.3.2 Calcitriol [1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>]

Calcitriol dient der Erhaltung der Calcium- und Phosphor-Konzentration im Blut, die für die Mineralisierung der Knochen erforderlich ist. Mittels zunehmender Synthese des Ca-bindenden Proteins (Calbindin) und der damit verbundenen Steigerung des Ca-Transports im Dünndarm sowie durch zunehmende Ca-Rückresorption in den Nieren wird der Blut-Calcium-Spiegel erhöht. Serum-Ca- und -P-Konzentrationen steuern anhand eines Feedback-Mechanismus die Biogenese von Vitamin D<sub>3</sub> (Krück, 1988). Bei einem Abfall des Calciums stimuliert PTH das Enzym 1 $\alpha$ -Hydroxylase und, als Folge der Synthese, die Ausschüttung von Calcitriol. Diese wiederum wird sowohl durch die direkte Aufnahme von Vitamin D<sub>3</sub> – in einem geringeren Umfang auch von vorwiegend aus Pflanzen stammenden Vitamin D<sub>2</sub> – als auch durch eine Hyperphosphatämie gehemmt.

Gemeinsam mit PTH beeinflusst Calcitriol ebenfalls die Regulierung der Ca- und P-Konzentrationen im Blut durch Mobilisation von Calcium und Phosphor aus den Knochen (Resorption).

#### 4.2.3.3 Calcitonin (CT)

CT ist - ähnlich dem PTH - ein Peptidhormon. Es verhindert eine Hypercalcämie und ist somit ein Gegenspieler des PTH (Kaune, 1999). Bei einem erhöhten Ca-Spiegel im Blut bewirkt CT eine vermehrte Ca-Einlagerung in das Skelett und eine verminderte Ca-Freisetzung daraus, indem es die Osteoklasten hemmt und die Proliferation der Osteoblasten fördert. Die Wirkung von CT auf die Nieren ist noch nicht eindeutig geklärt. Im Darm hat CT keinen Einfluss auf die Ca-Absorption (Kraft et al., 2005).

In Abbildung 5 ist das Zusammenspiel von PTH und Calcitriol für die Aufregulierung der Ca-Konzentration im Blut bei Hypocalcämie aufgezeigt.

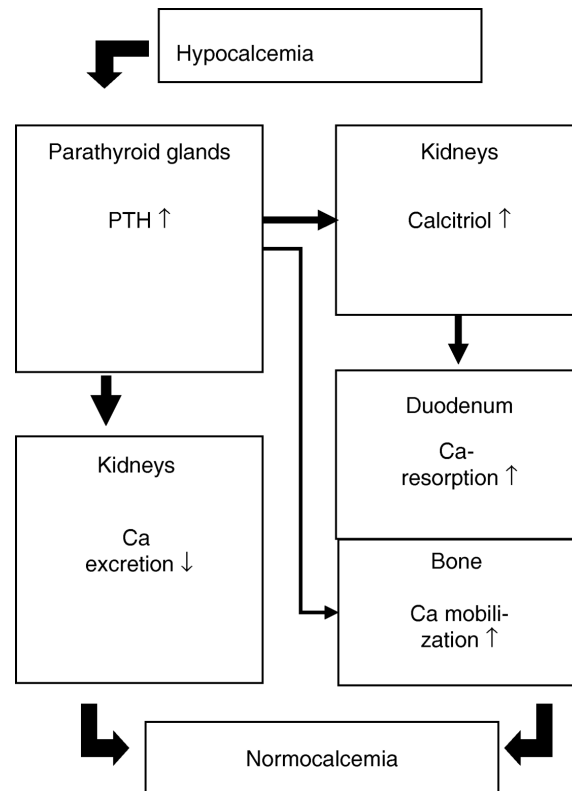


Abb. 5: Mechanismus der Ca-Homöostase bei Hypocalcaemie (Schröder und Breves, 2006)  
PTH = Parathormon; Ca = Calcium

#### 4.2.4 Calcium-Absorption im Darm

Calcium wird über das Epithel der Nierentubuli, des Darmtraktes, der Plazenta, der Milchdrüsen sowie der Kiemen beim Fisch absorbiert (Hoenderop et al., 2005). Auf Grund der spezifischen Thematik vorliegender Arbeit soll hier lediglich auf die intestinale Ca-Absorption der Säugetiere eingegangen werden.

Der Ca-Transport im Darm verläuft bidirektional, da Calcium sowohl resorbiert als auch mit den Verdauungssäften ins Darmlumen sezerniert wird (Scharrer und Wolfram, 2000). Die Ca-Aufnahme erfolgt bei Säugetieren auf zwei Arten: Einerseits von Calcitriol abhängig, aktiv transzellulär und andererseits von der Ca-Konzentration abhängig, passiv parazellulär. Bei grossen lumenseitigen Calcium-Mengen dominiert die passive Diffusion, bei niedrigen Mengen dagegen überwiegt die aktive, Vitamin D-abhängige, transzelluläre Ca-Absorption (Bronner, 1987).

## 4.2.4.1 Transzellulärer Ca-Transport

Die aktive transzelluläre Ca-Absorption (Abb. 6) erfolgt hauptsächlich im Dünndarm und kann in drei aufeinander folgende Schritte aufgeteilt werden:

1. Eintritt des Calciums in die Zelle über die Bürstensaummembran der Enterozyten. Dafür sind zwei Kanäle verantwortlich: epitheliale Ca-Kanäle (ECaC1) (auch als TRPV5 bezeichnet) und Ca-Transportproteine (CaT1) (auch als TRPV6 bezeichnet) (Hoenderop et al., 1999; Barley et al., 2000; Nijenhuis et al., 2003).
2. Diffusion des an Calbindin gebundenen Calciums durch das Zytoplasma. Calbindin ist ein Calcitriol-abhängiges, Ca-bindendes Protein (Calbindin-D<sub>9k</sub> und Calbindin-D<sub>28k</sub>).
3. Ca-Abgabe auf der basolateralen Seite der Enterozyten mittels einer entgegen eines 1000-fachen Konzentrationsgradienten arbeitenden Ca-Pumpe (Plasma-membran Ca<sup>2+</sup>-ATPase, PMCA1b) sowie mittels transmembranösen, durch den Na<sup>+</sup>-Gradienten angetriebenen, Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauschern (NCX1) (Nijenhuis et al., 2003).

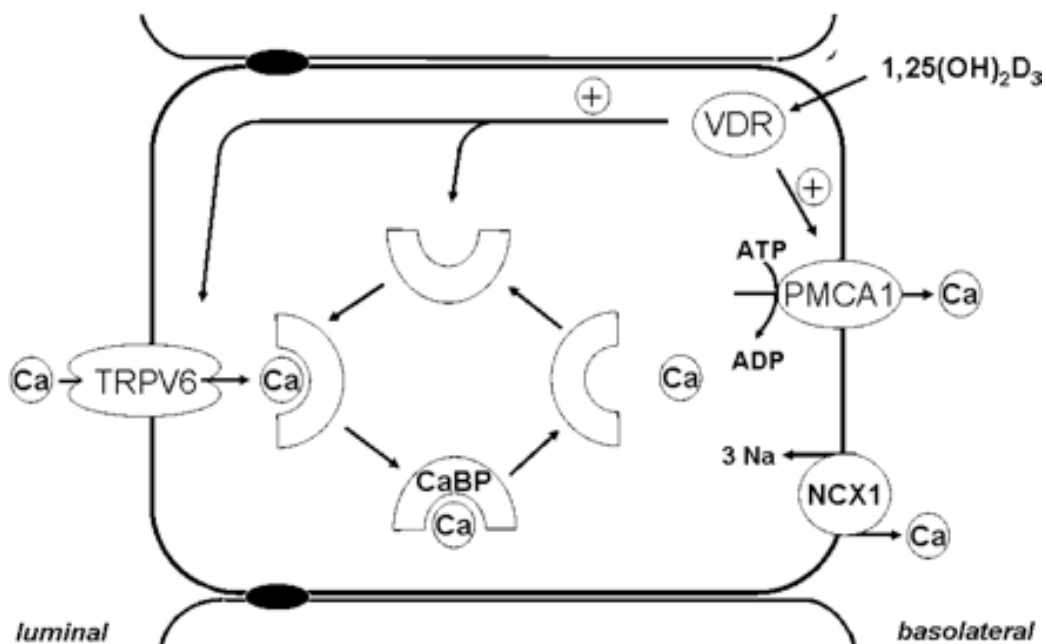


Abb. 6: Epithelialer, transzellulärer Ca-Transport und seine Regulation durch Calcitriol [1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>] (Dusso et al., 2005)  
 TRPV6 = apikaler Ca-Kanal; CaBP = Ca-bindendes Protein, Calbindin;  
 PMCA1 = Plasmamembran-Ca-ATPase; NCX1 = Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauscher



Neben dem pH-Wert, Ca-abhängigen regulatorischen Mechanismen, Kanaltransporte auf der luminalen Plasmamembran und Kanal-assoziierte Proteine wie z. B. Calmodulin, stellt das Vitamin D-Hormon Calcitriol (1,25-dihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub>) einen wichtigen Faktor in der Regulierung der aktiven Ca-Absorption dar. Dabei beeinflusst Calcitriol die Genexpression von Proteinen wie Calbindin und TRVP5/6, die an der aktiven transzellulären Ca-Aufnahme beteiligt sind. Die Einwirkung des Calcitriols auf die Ca-Pumpe und den Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauscher an der basolateralen Seite der Enterozyten ist noch nicht vollständig geklärt (Hoenderop et al., 2005). In Kapitel 4.3 und 4.4 wird näher auf die Rolle des Vitamin D<sub>3</sub> und seines Rezeptors (VDR) eingegangen.

#### 4.2.4.2 Parazellulärer Ca-Transport

Dieser passive Vorgang (Abb. 7) gestattet einen direkten Austausch von Calcium zwischen zwei Kompartimenten (Hoenderop et al., 2005). Der parazelluläre Ca-Transport zieht sich über die gesamte Länge des Darmes hinweg und erfolgt passiv, entlang eines elektrochemischen Gradienten (Bronner, 1987). Die Calcium-Ionen (Ca<sup>2+</sup>) diffundieren vom Darmlumen aus durch die *tight junctions* an der apikalen Seite der polarisierten Darmepithelzellen in die Interstitialflüssigkeit, bevor sie ins Blut gelangen. Die Diffusionsrate hängt von der Konzentration der durchlässigen Ionen, in diesem Fall Ca<sup>2+</sup>, und vom elektrischen Gradienten des Epithels ab. Der passive Durchfluss über die *tight junctions*, und somit die Permeabilität des Epithels, kann indirekt durch Hormone und den elektrochemischen Gradienten tangierende Stoffe, sowie direkt über Wachstumsfaktoren, Zytokine, Bakterientoxine und weitere modulierende Substanzen beeinflusst werden (Hoenderop et al., 2005).

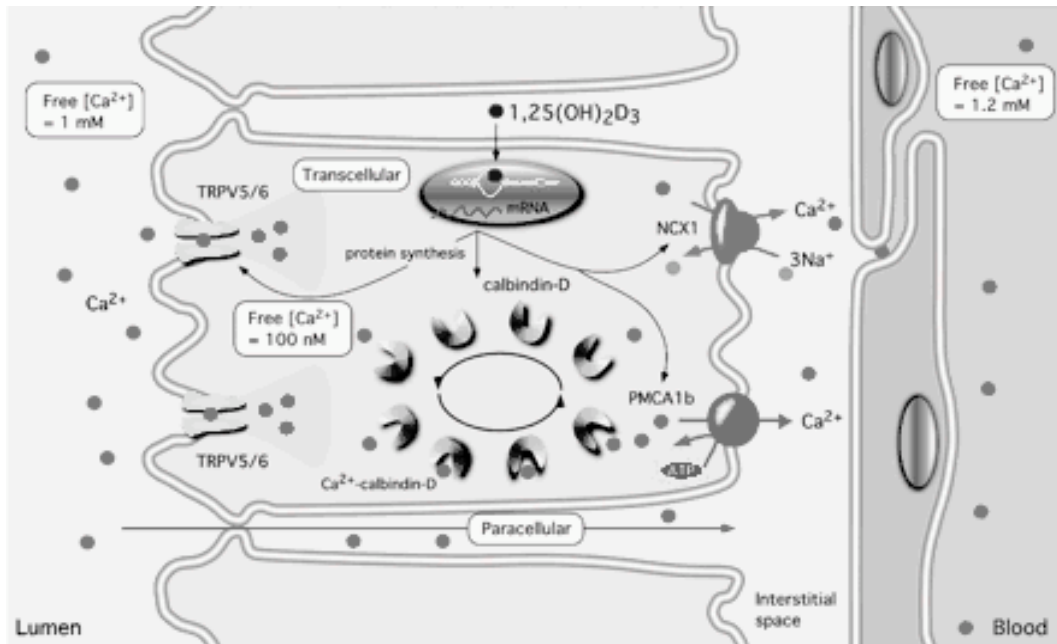


Abb. 7: Vergleich zwischen der aktiven transzellulären und der passiven parazellulären Absorption von Calcium im Darm (Hoenderop et al., 2005)  
 TRPV6 = apikaler Calcium-Kanal; CaBP = Ca-bindendes Protein, Calbindin; PMCA1 = Plasmamembran-Ca-ATPase; NCX1 = Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauscher

### 4.3 Vitamin D

Vitamine sind niedermolekulare organische Verbindungen, die von Mensch und Tier nicht oder nur unzureichend synthetisiert werden und für physiologische Abläufe essentiell sind. Dementsprechend führen Mangelsituationen zu spezifischen Erkrankungen (Schweigert, 1999).

Hormone sind Substanzen, die an spezifische zelleigene Rezeptoren binden und ihre Wirkung über die Aktivierung von Genen oder über die Bildung intrazellulärer Signalmoleküle (second messenger) entfalten (Meinecke, 1999).

Vitamin D (Calciferol), ist ein Steroidderivat und wird einerseits zu den fettlöslichen Vitaminen gezählt. Eine Mangelversorgung führt zu typischen Krankheitserscheinungen wie Rachitis oder Osteomalazie. Andererseits hat Vitamin D nach der Bindung an seinen Rezeptor die Fähigkeit, die Genexpression spezifischer Proteine zu beeinflussen. Daher wird das aktive Vitamin D auch zu den Steroidhormonen gezählt. Die zwei wichtigsten Vertreter dieser Steroid-Derivate sind Cholecalciferol (Vitamin D<sub>3</sub>) und Ergocalciferol (Vitamin D<sub>2</sub>).

#### 4.3.1 Stoffwechsel von Vitamin D

Vitamin D wird bei den Säugetieren unter dem Einfluss von UV-Strahlen der Wellenlänge 280-320 nm in der Haut aus Cholesterol gebildet (DeLuca und Holick, 1979). Dabei entsteht durch Photolyse und Thermoisomerisierung aus 7-Dehydrocholesterol Provitamin D<sub>3</sub> und anschliessend Vitamin D<sub>3</sub> (Cholecalciferol), ein Seco-Steroid (Norman et al., 2001) (Abb. 8). Das in Pflanzen vorkommende und mit der Nahrung aufgenommene Vitamin D<sub>2</sub> (Ergocalciferol) wird in gleicher Art und Weise durch photolytische Prozesse zu Calcitriol umgewandelt. Seine biologische Wirksamkeit beträgt allerdings nur ein Drittel jener des eigensynthetisierten Vitamin D<sub>3</sub> (Armas et al., 2004).

Das eigensynthetisierte oder oral aufgenommene, biologisch inaktive Provitamin D (Provitamin D<sub>3</sub> und Provitamin D<sub>2</sub>) gelangt, an Plasmaproteine gebunden, in die Leber, wo eine enzymvermittelte Hydroxylierung (25-Hydroxylase) am C25-Atom stattfindet. Das dabei entstandene 25-hydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> (Calcidiol) wird, an spezifische Proteine (Vitamin D-bindende Proteine, DBP) gebunden, zur Niere transportiert. In den Mitochondrien des proximalen Tubulusepithels hydroxyliert ein weiteres Enzym (1 $\alpha$ -Hydroxylase) das Calcidiol am C1-Atom, welches somit in seine aktive Form, 1,25-dihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> (Calcitriol, Vitamin D-Hormon), umgewandelt wird. Im Gegensatz zur 25-Hydroxylase der Leber, unterliegt die 1 $\alpha$ -Hydroxylase der Niere einem strengen Regulationsmechanismus (Dusso et al., 2005). Ihre Aktivität wird durch Parathormon (PTH) wie auch durch abnehmende Ca- und P-Konzentrationen im Blut stimuliert, während sie durch Calcitriol selbst gehemmt wird (Kaune, 1999). Die hohe biologische Wirksamkeit des Vitamin D-Hormons erfordert in den Zielzellen, vor allem in der Niere, eine Regulierung der betreffenden Aktivität. Dies erfolgt über die – durch Vitamin D selbst induzierte – 24-Hydroxylase, wobei es nach den Oxidationen an den C24- und C23-Atomen zur Seitenkettenabspaltung kommt, was die Inaktivierung zur Folge hat. Das Enzym 24-Hydroxylase hydroxyliert und inaktiviert somit sowohl Calcidiol (25-hydroxy-Vitamin D<sub>3</sub>) wie auch Calcitriol (1,25-dihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub>) zu 24,25-dihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> [24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>] bzw. 1,24,25-trihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> [1,24,25-(OH)<sub>3</sub>D<sub>3</sub>] (DeLuca und Holick, 1979).

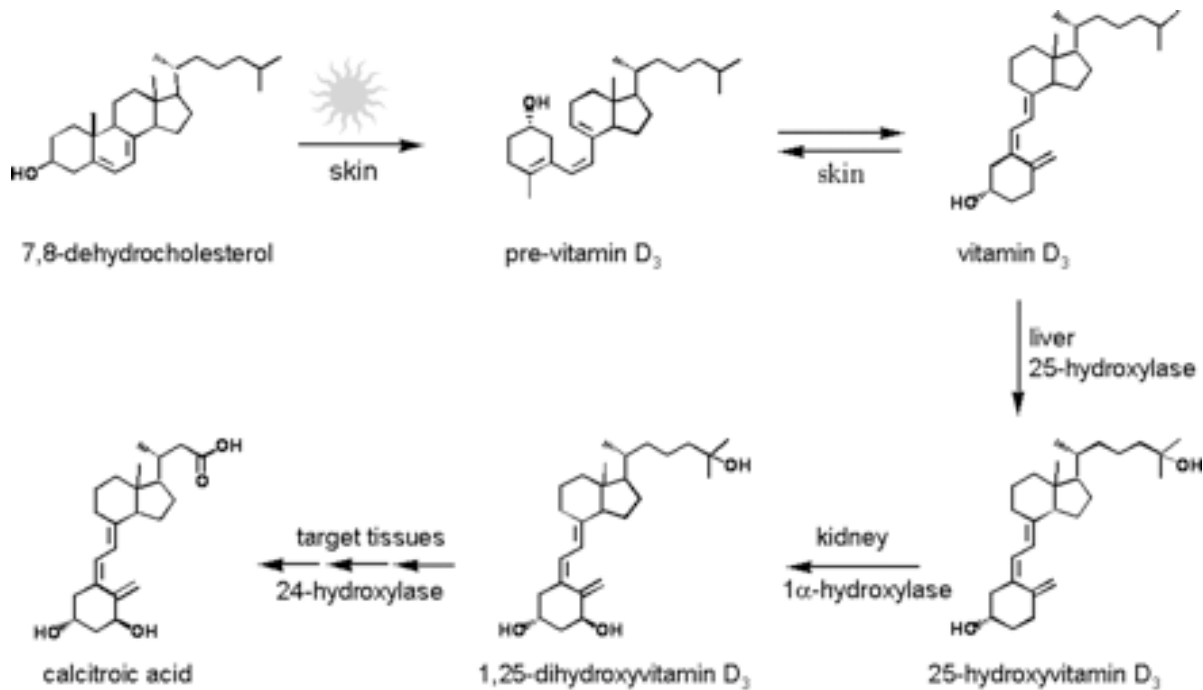


Abb. 8: Synthese von Vitamin D<sub>3</sub> sowie seine hepatische und renale Aktivierung zum Calcitriol (Calcitroic acid) (Dusso et al., 2005)

#### 4.3.2 Wirkungsmechanismus von Vitamin D

Vitamin D-Metaboliten sind lipophile Moleküle. Sie zirkulieren im Blut grösstenteils an Plasmaproteine gebunden, zu denen das Vitamin D-bindende Protein (DBP) aber auch Albumine und Lipoproteine gehören (DeLuca und Holick, 1979; Norman et al., 1992). Nur etwa 5 % der Vitamin D-Hormone sind ungebunden und gelangen wegen ihrer lipophilen Eigenschaften mittels einfacher Diffusion in die Zellen. Die Vitamin D-Metaboliten werden im Blut durch die Bindung an Proteine an der Diffusion gehindert. Dies verringert somit deren Anfälligkeit für den hepatischen Stoffwechsel, die darauf folgende biliäre Ausscheidung und führt zu einer Verlängerung ihrer Halbwertszeit im Blut (Dusso et al., 2005).

In der Zielzelle bindet Calcitriol an seinen vorwiegend im Kern lokalisierten Rezeptor, den Vitamin D-Rezeptor (VDR). Dieser Hormon/Rezeptor-Komplex verändert daraufhin als aktiver Transkriptionsfaktor die Transkription von Genen.

Neben dem Ca-(und P-)Stoffwechsel, bei dem Calcitriol als Steroidhormon auf die aktive enterale und renale Ca-Absorption einwirkt (Kapitel 4.2.2.1) und so die Bildung von Ca-Kanälen an der Zellmembran (TRPV5/6) sowie von intrazellulären Ca-Transportproteinen (Calbindin-D<sub>28k</sub> und Calbindin-D<sub>9k</sub>) fördert, beeinflusst Calcitriol durch seine zusätzliche, 'nicht-calcitrope' Wirkung verschiedene Mechanismen im

Organismus. Zu diesen gehören unter anderem die Beeinflussung des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung, die Regulierung des programmierten Zelltodes (Apoptose), die Steuerung der Peptidhormon-Sekretion (z. B. PTH, Insulin, Prolactin), die Kontrolle über die Muskelfunktion und über das Nervensystem sowie die Modulation des Immunsystems mittels Unterdrückung von Interleukinen und Interferonen (Haussler, 1986; Haussler et al., 1998; Dusso et al., 2005).

## **4.4 Vitamin D-Rezeptor (VDR)**

### **4.4.1 Lokalisation, Molekulargewicht und Vorkommen**

Das Vitamin D<sub>3</sub>-Hormon Calcitriol [1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>] zählt neben den Steroidhormonen, dem Thyroxin und der Retinsäure zu den wichtigsten lipophilen Hormonen, die frei in die Zielzelle diffundieren (Meinecke, 1999). Die Retention des hormonalen Liganden in der Zielzelle wird durch die spezifische, hoch-affine Bindung an seinen Hormonrezeptor im Zellinneren vereinfacht (Jurukta et al., 2001).

Der VDR gehört innerhalb der Steroidrezeptor-Superfamilie der Subfamilie (Klasse II), den Schilddrüsenhormonen ähnlichen Rezeptoren an (Mangelsdorf et al., 1995). Wie der Thyroidhormon-Rezeptor (TR) und der Retinoid-Acid-Rezeptor (RAR), ist der Vitamin D-Rezeptor (VDR) ein DNS-assoziiertes, hormon-aktivierter Transkriptionsfaktor, der anhand seiner Lokalisation vorwiegend zu den Kernproteinen zählt (Haussler et al., 1998). Als Phosphoprotein hängt seine Aktivität und Expression von posttranslationellen Modifikationen ab, z. B. von der Phosphorylierung/Dephosphorylierung (Jurukta et al., 2001). Durch zahlreiche Kinasen werden Steroidhormonrezeptoren und die mit ihnen assoziierten Proteine an unterschiedlichen Stellen phosphoryliert (Weigel und Moor, 2007). Auf diese Weise werden, hormonunabhängig, unter anderem die Sensitivität der Hormonantwort, die subzelluläre Lokalisation, die DNS-Bindung, die DNS-Expression, die DNS-Stabilität sowie die Einwirkung auf Protein/Protein-Interaktionen beeinflusst.

#### **4.4.1.1 Lokalisation**

Neben intrazellulären VDR (VDR<sub>nuc</sub>) sind auch membranständige VDR (VDR<sub>mem</sub>) vorzufinden (Nemere et al., 2000; Norman et al., 2001). VDR<sub>nuc</sub> und VDR<sub>mem</sub> interagieren mit unterschiedlichen Konformationen des flexiblen 1,25-dihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub>-Moleküls. Die Konformationen 6-s-trans-1,25-dihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> und

6-s-cis-1,25-dihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub>, die aus einer Rotation um 90° an der 6,7-Carbon-Carbon Bindung resultieren (Abb. 9), werden im Allgemeinen vom VDR bevorzugt. Je nach Form des Vitamin D<sub>3</sub>-Moleküls wird entweder der VDR<sub>nuc</sub> – durch 6-s-trans-1,25-dihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> – aktiviert, der die Bildung neuer Proteine, wie Calbindin, fördert, oder der VDR<sub>mem</sub> – durch 6-s-cis-1,25-dihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> – wird angeregt, der zur Aktivierung von Enzymen führt (Norman et al., 1997; Norman et al., 2001). Der Reaktionsweg über die VDR<sub>mem</sub> ist ein schneller Prozess (rapid response; Sekunden bis Minuten), im Gegensatz zur langsamen genomischen Antwort (genomic response; 60 Minuten bis Stunden) auf die Aktivierung der VDR<sub>nuc</sub> (Norman et al., 1992; Norman, 2006).

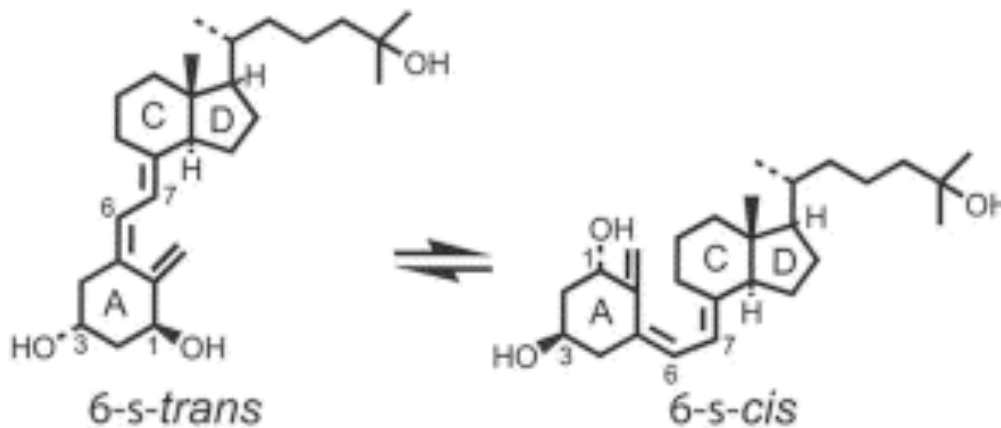


Abb. 9: 6-s-trans- und 6-s-cis-Konformationen von Vitamin D (Norman et al., 1997)

#### 4.4.1.2 Molekulargewicht

Nach bisherigen Untersuchungen bei verschiedenen Tierarten liegt das Molekulargewicht des VDR bei 48 bis 60 kDa (Haussler, 1986; Bronner, 1987).

#### 4.4.1.3 Vorkommen

Heute ist bekannt, dass VDR neben der Beeinflussung des endokrinen Systems (1,25-dihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub>) in den klassischen Organen wie Darm, Knochen und Nieren auch an weiteren Stellen nachgewiesen wurden. Zu diesen gehören zum Beispiel Pankreas (β-Zelle), Hypophyse, Geschlechtsorgane (Ovar, Hoden, Uterus, Plazenta, Gesäuge), Haut sowie Lymphozyten, Keratinozyten und verschiedene Tumorzellen (Haussler, 1986; Riner et al., 2007; 2008).

#### 4.4.2 Struktur und Funktion des Vitamin D-Rezeptors

Der VDR besteht aus einer Polypeptidkette, die verschiedene funktionelle Domänen aufweist (Abb. 10). Davon sind zwei für Steroid-Rezeptoren charakteristisch. Zum einen ist dies die am N-terminalen Ende lokalisierte, stark konservierte DNS-Bindungsdomäne mit ihren so genannten "Zinkfingern", deren typische Aminosäuresequenz fingerähnliche Aminosäuren-Schleifen bilden. Wie in Abbildung 10 ersichtlich, ist dieser Abschnitt durch eine Anhäufung der Aminosäure Cystein gekennzeichnet, wobei jeweils vier Cysteinmoleküle, die durch ein Zinkatom fixiert sind, den Grundstock dieser fingerartigen Struktur bilden. Diese "Zinkfinger" unterscheiden sich bei den verschiedenen Steroidhormon-Rezeptoren (Meinecke, 1999). Bei inaktiven, ungebundenen Rezeptoren sind die Zinkfinger ferner durch ein Protein verdeckt. Zum anderem befindet sich am C-terminalen Ende des Rezeptorproteins die Hormonbindungsdomäne (Haussler, 1986).

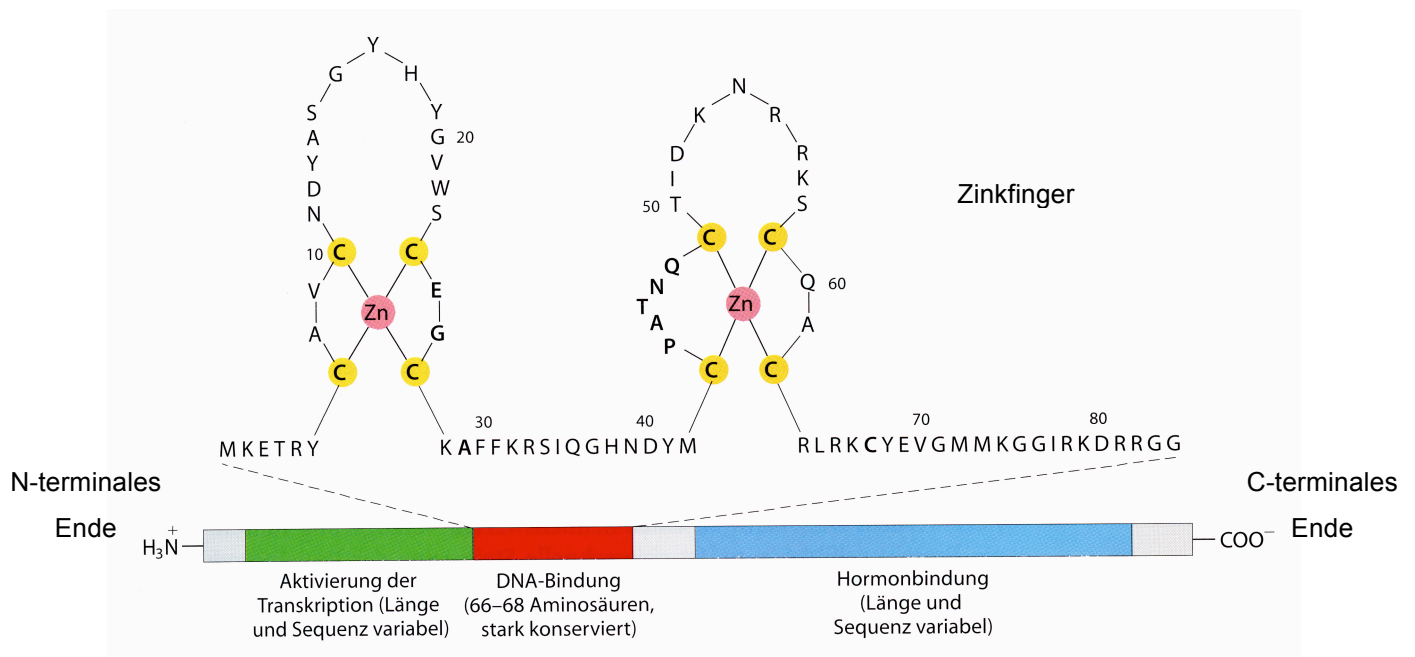


Abb. 10: Schematische Darstellung des Vitamin D-Rezeptors mit dessen wichtigsten Domänen und der Zinkfingerstruktur an der DNA-Bindungsdomäne (Nelson und Cox, 2001)

Nach dem Eintritt in die Zelle bindet Calcitriol an den VDR. Der Hormon-Rezeptor-Komplex wird anschliessend der bereits erwähnten Phosphorylierung unterzogen. Zugleich wird das die Zinkfinger verdeckende Protein abgespalten, wodurch sich der Hormon-Rezeptor-Komplex mit einem nukleären Hilfsfaktor, dem Retinoid-X-

Rezeptor (RXR), verbinden kann. Das entstandene VDR/RXR-Heterodimer besitzt eine hohe Affinität zu spezifischen regulatorischen Sequenzen der DNS, den Vitamin D-Response-Elements (VDRE), die in der Promotorregion von Vitamin D-regulierten Zielgenen liegen (Jurukta et al., 2001; Dusso et al., 2005). Die Anlagerung des VDR/RXR-Heterodimers an ein VDRE induziert die Bindung der RNS-Polymerase an diesen Komplex. Diesem Prozess folgt die Transkription der Vitamin D-abhängigen Gene (Dusso et al., 2005). Calcitriol erhöht auf diese Weise die Syntheserate bestimmter Proteine, die in den klassischen Zielgeweben (Darm, Knochen und Nieren) hauptsächlich der Erhaltung der Ca-Homöostase dienen (Haussler, 1986). Zu diesen gehören unter anderem die 24-Hydroxylase, die Alkalische Phosphatase, das Calbindin-D<sub>9k</sub>, das Calbindin-D<sub>28k</sub>, das Osteocalcin, die Ca<sup>2+</sup>-ATPase sowie der VDR selbst (Haussler et al., 1998).

#### 4.4.2.1 Regulierung des Vitamin D-Rezeptors

Die biologische Aktivität von Calcitriol ist, durch die notwendige Interaktion mit seinem Rezeptor, direkt proportional zur VDR-Konzentration im Gewebe (Rougui et al., 1998). So ist die Regulierung des VDR in den Zielgeweben ein wesentlicher Bestandteil für deren Ansprechbarkeit auf Calcitriol. Die Synthese des Rezeptors wird durch Calcitriol selbst reguliert, neben weiteren Einfluss nehmenden Hormonen wie Retinsäure, Glucocorticoide und Östrogene. Auch physiologische Umstände wie Alter, Trächtigkeit, Laktation sowie der Calciumgehalt der Nahrung beeinflussen die Menge der VDR, wie aus diversen Studien an Menschen, Ratten, Hühnern, Milchkühen, Schafen und Ziegen hervorgeht (Goff et al., 1990; Horst et al., 1990; Rougui et al., 1998; Zhu et al., 1998; Centeno et al., 2004; Walters et al., 2006; Liesegang et al., 2007). So besteht eine im Alter abnehmende VDR-Expression im Darm von Menschen und Ratten (Horst et al., 1990; Walters et al., 2006), was u.a. auf den im Alter auftretenden Östrogenmangel zurückzuführen ist (Liel et al., 1999). Die – als Folge der abnehmenden Östrogenkonzentration und somit der geringeren VDR-Synthese – reduzierte Ca-Absorption über den Darm könnte, gemäss Liel et al. (1999), eine Ursache für die Osteoporose der Frau darstellen.

Die Trächtigkeit sowie die Laktation scheinen durch den erhöhten Ca-Bedarf den VDR-Gehalt positiv zu beeinflussen (Zhu et al., 1998; Christakos und Prince, 2003; Horst et al., 2005; Liesegang et al., 2007). Zhu et al. (1998) vermuten dabei einen



posttranskriptionellen Vorgang, da weder während der Trächtigkeit, noch der Laktation eine Erhöhung der VDR-mRNS beobachtet werden konnte.

Der Einfluss des Ca-Gehaltes der Fütterung auf die VDR-Expression ist erwiesen. So weist die Studie von Rougui et al. (1998) einen Zusammenhang zwischen dem Ca-Gehalt des Futters und der VDR-Expression auf, wonach der Gehalt an VDR einerseits nicht zwangsläufig mit einer Neu-Synthese der mRNA einhergeht, andererseits in Zielgeweben sowohl vom Calcitriol selbst – der aktiven Form des Vitamin D<sub>3</sub> – als auch vom Calcium abhängen kann. So haben Calcitriol und Calcium einen unterschiedlichen, gewebespezifischen Einfluss auf die Expression des VDR. In allen drei von Rougui et al. (1998) untersuchten Geweben (Epidermis, Niere, Darm) wirkt sich Calcitriol auf die Höhe der Zunahme des VDR-Proteins aus, dem posttranslationellen Vorgang der Rezeptorsynthese. Calcitriol beeinflusst jedoch nur in der Epidermis den Gehalt an VDR mittels Neu-Synthese der VDR-mRNS. Im Darm regt eine erhöhte Ca-Absorption die VDR-mRNS-Synthese an.

Die Studie von Centeno et al. (2004) bestätigt ebenfalls eine Korrelation zwischen dem Ca-Gehalt im Futter und der VDR-Expression. Dabei führt eine Ca-Mangelernährung zu deutlich tieferen VDR-Werten in den Enterozyten – im Gegensatz zu Kontrolltieren. Gleichzeitig ist das Calcitriol im Serum bei einem Ca-Mangel erhöht, was über Zelldifferenzierung zu einer Aufregulierung von Vitamin D-abhängigen Proteinen für die transzelluläre Ca-Absorption führt, um den Mineralstoffmangel zu kompensieren.

## **5 Material und Methoden**

### **5.1 Versuchstiere**

Die im Rahmen dieser Untersuchungen entnommenen Darmproben stammten von Kaninchen der Rasse Weisse Neuseeländer-Hybriden. Vierundzwanzig (14 w, 10 m) fünf bis sechs Wochen alte Kaninchen aus einer Zucht für Mastkaninchen wurden fünf Monate lang in vier Gruppen zu je sechs Tieren gemischten Geschlechtes gehalten. Die vier Gruppen wurden unterschiedlich gefüttert: 'Gruppe L' mit pelletiertem Futter aus Luzernemehl, 'Gruppe G' mit pelletiertem Futter aus Grasmehl, 'Gruppe LG' mit pelletiertem Futter aus Luzerne- & Getreidemehl und 'Gruppe GG' mit pelletiertem Futter aus Gras- & Getreidemehl. Die vier verwendeten pelletierten Futtermittel wurden von der Firma Provimi-Kliba SA in Kaiseraugst hergestellt. Den Kaninchen standen Futter und Wasser ad libitum zur Verfügung.

Die Analyse der Zusammensetzung der vier Futterpellets wurde im Labor des Institutes für Tierernährung der Vetsuisse Fakultät Universität Zürich durchgeführt (Tab. 7).

### **5.2 Aufarbeitung des Versuchsmaterials**

Die Tötung der 24 Versuchskaninchen erfolgte im Alter von 25-26 Wochen. Jedes Tier wurde mit einem Bolzenschussapparat betäubt und anschliessend durch Ausbluten getötet. Die darauf folgende Sektion fand im Institut für Veterinärpathologie der Vetsuisse Fakultät Universität Zürich statt.

Während der Sektion wurde der Magen-Darm-Trakt jeweils in toto entnommen. Nach der Entfernung des Darminhaltes wurden für die Histologie und die Immunhistochemie bei jedem der 24 Kaninchen aus fünf verschiedenen Darmabschnitten – Duodenum, Jejunum, Ileum, Caecumkörper und Colon – jeweils eine Darmprobe von etwa 1-4 cm Länge entnommen (Abb. 11), unmittelbar in 4%iges neutral gepuffertes Formalin gegeben und darin 24 Stunden bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

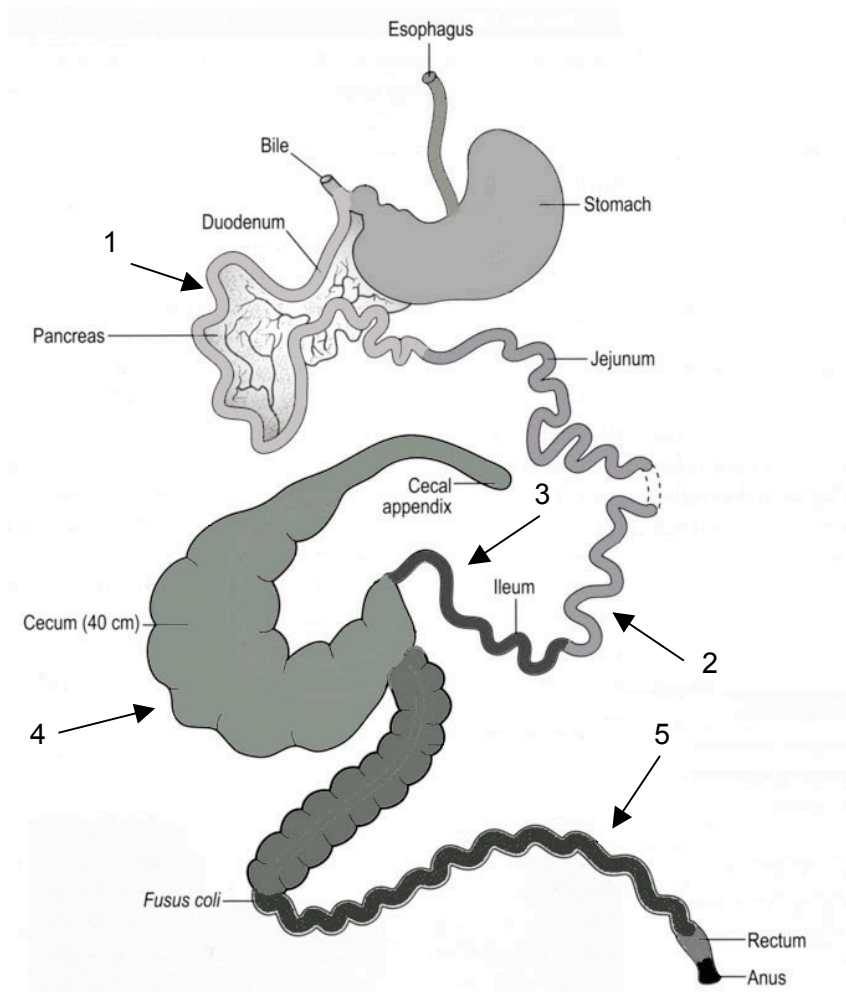


Abb. 11: Schematische Darstellung des Magen-Darm-Traktes beim Kaninchen und die Lokalisationen (1-5) der entnommenen Darmabschnitte für den immunhistochemischen Nachweis des VDR (modifiziert nach O'Malley, 2005)  
1 Duodenum; 2 Jejunum; 3 Ileum; 4 Caecum; 5 Colon

Nach der 24stündigen Fixierung wurden die Proben gewässert, in der aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Einbettkassetten (Jet Kassetten®, Leica, Nussloch, D) gebracht. Die darauf folgende Paraffineinbettung wurde maschinell mittels Gewebeeinfiltrationsautomaten (TP1020®, Leica, Nussloch, D) und Paraffin-ausgießstation (EG1160®, Leica, Nussloch, D) durchgeführt. Das Protokoll zur Entwässerung und Infiltration der Gewebeproben mit Paraffin ist der Tabelle 8 zu entnehmen.

Die für die immunhistochemischen Färbungen benötigten 5µm dicken Paraffinschnitte wurden mit dem Rotationsmikrotom (RM1160®, Leica, Nussloch, D) angefertigt, anschliessend auf Adhäsions-Objektträger (SuperFrost Plus® Menzel-Gläser, Braunschweig, D) aufgezogen und in einem Wärmeschrank (BE 400/3 TWW, Memmert GmbH, Schwabach, D) für etwa 12 Stunden bei 37°C festgetrocknet.

## 5.3 Immunhistochemischer Nachweis des Vitamin D-Rezeptors (VDR)

### 5.3.1 Immunhistochemie

Der Begriff Immunhistochemie fasst eine Reihe gängiger Methoden zur Sichtbarmachung von gewebe- und zellspezifischen Strukturen mittels Antigen-Antikörper-Reaktion zusammen. Es werden direkte und indirekte immunhistochemische Methoden unterschieden (Noll und Schaub-Kuhnen, 2000).

Bei der direkten Nachweismethode werden spezifische, bereits mit Markerenzymen (alkalische Phosphatase oder Peroxidase) oder Fluorochromen konjugierte Antikörper eingesetzt. Wesentlicher Nachteil dieses Verfahrens ist die geringe Signalverstärkung.

Bei den indirekten immunhistochemischen Methoden handelt es sich um Verfahren mit hoher Sensitivität (Noll und Schaub-Kuhnen, 2000). Hierbei bindet ein unkonjugierter spezifischer Antikörper an das gesuchte Antigen. In einem weiteren Schritt wird der Schnitt mit den Antigen/Primärantikörperkomplexen mit einem Sekundärantikörper inkubiert, welcher mit einem Markerenzym oder Fluorochrom markiert ist.

#### 5.3.1.1 ABC-Methode

Die in der vorliegenden Untersuchung gewählte Variation der indirekten ABC-Methode (**A**vidin-**B**iotin-**C**omplex) nutzt die starke Affinität von Avidin zu Biotin. Die vom Hersteller bereits mit Biotin markierten (biotinylierte) Primärantikörper binden an die gesuchten Antigene. In einem weiteren Schritt binden Avidin-Biotin-Enzymkomplexe an das Biotin der Primärantikörper (Noll und Schaub-Kuhnen, 2000).

Bei diesen Komplexen handelt es sich um das Glykoprotein Avidin, welches an drei der vier Bindungsstellen mit einem biotinyliertem Enzym (z.B. Meerrettichperoxidase) gekoppelt ist. Die Bindung des wasserlöslichen Vitamins Biotin (Vitamin H) zu Avidin kann bis eine Million stärker sein als gewöhnliche Antigen/Antikörper-Bindungen. Diese Methode ist daher sehr robust und aufgrund der mehrfach konjugierten Enzymmoleküle ergibt sich eine ausgeprägte Verstärkung des Signals.

Für die Visualisierung der Antigenlokalisation kann das Chromogen 3-3'-Diaminobenzidin (DAB) eingesetzt werden. Das reversibel blockierte ABC-Enzym

wird durch das als Elektronendonator wirkende Chromogen aktiviert. Dabei wird ein in Alkohol und anderen organischen Lösungsmitteln unlösliches braunes Farbprodukt gebildet.

### **5.3.2 Immunhistochemische Färbung**

Für die Darstellung des VDR wurde die oben genannte ABC-Variation gewählt.

Nach der Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnittpräparate erfolgte eine hitzeinduzierte Antigendemaskierung. Dabei wurden die Präparate 3 x 5 min bei 100° C und 600 Watt in 0,01 M Citratpuffer pH 6 (ProTaq, BioCyc, Luckenwalde, D) gekocht. Die darauf folgende Inkubation in einer 3 % Wasserstoffperoxidlösung blockierte spezifische Proteine wie die endogene Peroxidase, während unspezifische Bindungen an endogenes Biotin mit einem Avidin/Biotin-Blocking-Kit (Vector Laboratories, Genf, CH) gehemmt wurden. Um einer allfälligen Hintergrundfärbung entgegenzuwirken und die Resultate zu optimieren wurde zusätzlich ein Protein-Block-Serum-Free (X0909, DakoCytomation, Zug, CH) verwendet.

Für den Nachweis des VDR diente der monoklonale biotinylierte Antikörper Ab-1 (Rat Monoclonal Antibody, Clone 9A7γ.E10.E.4, Lab Vision Corporation, Freemont CA, USA). Nach Angaben des Herstellers reagiert der Antikörper sowohl mit der besetzten als auch der unbesetzten Form des VDR und weist keine Kreuzreaktionen mit Östrogen- und Glukokortikoid-Rezeptoren auf.

Mit der in 5.3.1.1 erwähnten ABC-Variation (StrepABComplex/HRP, K0377, DakoCytomation, Zug, CH) wurde die Lokalisation des Antigen/Antikörper-Komplexes eruiert und mittels dem Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB+ Chromogen, K3467, DakoCytomation, Zug, CH) sichtbar gemacht.

Der Visualisierung der VDR-Lokalisation folgte eine Gegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer (Romeis, 1989). Dies führte zu einer blauen Anfärbung der VDR-negativen Zellkerne, die sich dadurch deutlich von den positiven, braun gefärbten Nuclei unterscheiden liessen.

Die immunhistochemische Färbung wurde gemäss dem Immunhistochemie-Protokoll im Anhang (Tab. 9) durchgeführt.

#### 5.3.2.1 Kontrollen

Es wurden bei jedem Färbedurchgang sowohl Positiv- als auch Negativkontrollen mitgeführt, die der Prüfung des Verfahrens und der verwendeten Reagenzien dienten. Für die Positivkontrolle wurden zuvor überprüfte Duodenumschnitte eines Rindes ausgewählt. Die Negativkontrollen wurden anstelle des Primärantikörpers mit einem Non-immune-Serum gleicher Konzentration (N-Universal Negative Control Mouse, N1698, DakoCytomation, Zug, CH) inkubiert.

### 5.4 Auswertung

Alle immunhistochemisch angefärbten Schnitte wurden zunächst unter dem Mikroskop (Leica DMLB®, Heerbrugg, CH) bei einer 200-fachen Vergrößerung beurteilt. Dabei wurde vor allem auf eine homogene Anfärbung und die Erhaltung der intakten Darmschleimhaut geachtet.

Für die semiquantitative Auswertung des VDR-Gehalts in der Darmschleimhaut wurden in allen Darmabschnitten jeweils drei zu beurteilende Ausschnitte à 500 Zellen aus verschiedenen Gesichtsfeldern ausgewertet.

In den Dünndarmabschnitten – Duodenum, Jejunum, Ileum – wurde im Oberflächenepithel zwischen der Zottenbasis und der Zottenspitze eine fiktive Linie gezogen, woraus sich die Ausschnitte Oberflächenepithel basal (ObEp basal), von der Kryptenmündung hin zur Zottenmitte, und Oberflächenepithel apikal (ObEp apikal), von der Zottenmitte zur Zottenspitze, ergaben. Das Drüsenepithel (DrEp) wurde als einzelner Ausschnitt beurteilt.

In den Dickdarmabschnitten – Caecum, Colon – wurde das Oberflächenepithel (ObEp) auf Grund homogenerer Anfärbung nicht unterteilt. Die Drüsenschicht der Lamina propria wurde unterteilt in einen basalen (DrEp basal) und einen apikalen Ausschnitt (DrEp apikal).

Die stets negativ gefärbten Becherzellen wurden nicht in die semiquantitative Auswertung miteinbezogen.

Je nach Grad der Braunfärbung wurden die Zellkerne in 5 Kategorien eingeteilt: negativ, sehr schwach, schwach, mittelstark und stark angefärbte Kerne der Enterozyten. Nach dem Erfassen der Farbintensität (FI) – FI<sub>0</sub> = negativ; FI<sub>0,5</sub> = sehr schwach positiv; FI<sub>1</sub> = schwach positiv; FI<sub>2</sub> = mittelstark positiv; FI<sub>3</sub> = stark positiv – und deren Häufigkeit (n) konnte der immunreaktive Score (IRS) errechnet werden

(Tab. 3), indem die jeweilige Anzahl Zellkerne ( $n(FI)$ ) mit einem exponentiellen Umrechnungsfaktor für die Farbintensität – 0 (negativ), 0,25 (sehr schwach), 1 (schwach), 4 (mittelstark), 9 (stark) – multipliziert und die Einzelprodukte addiert wurden (Boos et al., 2007; Riner et al., 2007; Riner et al., 2008).

$$\text{VDR-IRS} = 0 \times n(FI_0) + 0,25 \times n(FI_{0,5}) + 1 \times n(FI_1) + 4 \times (FI_2) + 9 \times (FI_3)$$

Tab. 3: Immunreaktiver Score (IRS) in Abhängigkeit vom jeweiligen Anfärbungsgrad der Zellkerne

IRS	Anfärbung der Zellkerne
0	negativ
1-125	sehr schwach positiv
126-500	schwach positiv
501-2000	mittelstark positiv
2000-4500	stark positiv

Wenn keine VDR vorhanden und die Zellkerne somit durch die Gegenfärbung blau angefärbt sind, ergibt sich daraus ein IRS von Null. Bei einer maximal möglichen Anfärbung durch sehr grosse Mengen an Rezeptoren ergäbe sich ein IRS von 4500. Ein errechneter IRS zwischen dem minimalen (0) und dem maximalen Wert (4500) stellt die durchschnittliche Färbintensität des beurteilten Ausschnittes dar.

## 5.5 Statistik

Aus dem IRS aller Darmausschnitte wurde sowohl der Mittelwert (MW) als auch die Standardabweichung (STD) berechnet.

Darauf folgte die statistische, nicht-parametrische Auswertung der Versuchsdaten mithilfe des Systat-Programms (SYSTAT 7, Systat Software Inc., Point Richmond CA, USA).

Mittels wiederholter mehrdimensionaler Varianzanalysen (ANOVA und MANOVA) wurden die Resultate auf allfällig auftretende Signifikanzen der einzelnen Gruppen und der Darmabschnitte geprüft.

Für die Gruppenunterschiede wurde ein Kruskal-Wallis-Test und als Folgetest ein Mann-Whitney-U-Test gewählt, zwei ungepaarte Rangsummenteste, die mehrere

bzw. zwei Gruppen miteinander vergleichen. Allfällige Signifikanzen innerhalb der Darmabschnitte wurden mittels gepaartem Wilcoxon-Vorzeichen-Rangsummen-Test ermittelt.

Die Testergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurden als statistisch signifikant erachtet.



## **6 Resultate**

### **6.1 Immunhistochemischer Nachweis von Vitamin D-Rezeptoren**

Untersucht wurden die Darmabschnitte Duodenum, Jejunum, Ileum, Caecum und Colon auf das Vorhandensein und die Verteilung von Vitamin D-Rezeptoren (VDR). In allen Abschnitten konnten mittels immunhistochemischer Methodik VDR nachgewiesen werden.

#### **6.1.1 Histomorphologische Beschreibung**

Wie in Kapitel 5.4 beschrieben, wurden die Zellkerne des Drüsenepithels und des Oberflächenepithels der Darmabschnitte in fünf Kategorien eingeteilt. Durch die Gegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer (siehe 5.3.2) erschienen im Mikroskop die VDR-negativen Zellkerne blau, die sehr schwach positiven Kerne grau, die schwach positiven beige bis hellbraun, die mittelstark positiven braun und die stark positiven dunkelbraun.

Aus allen ausgewerteten Resultaten – mit der Ausnahme des Colons – ging eine signifikant stärkere Anfärbung des Drüsenepithels als des Oberflächenepithels hervor. Im Dünndarm nahm die immunhistochemische Reaktion des Oberflächenepithels von der Zottenbasis (im Mittel schwach positiv) zur Zottenspitze (sehr schwach positiv) hin ab. Im Gegensatz dazu wies das Oberflächenepithel des Dickdarms eine tendenziell sehr schwache bis schwach positive Anfärbung auf.

Die drei Dünndarmabschnitte zeigten im Drüsenepithel wie auch im Oberflächenepithel eine von cranial nach caudal – in der Reihenfolge Duodenum, Jejunum, Ileum – abnehmende VDR-Immunreaktion auf.

Das Duodenum und das Jejunum wiesen beide eine mehrheitlich mittelstarke Kernfärbung im Drüsenepithel auf. Im stärker gefärbten Duodenum waren neben vereinzelt schwachen, sehr schwachen und negativen auch stark braungefärbte Zellkerne zu finden (Abb. 12). Im entsprechenden Epithelabschnitt des Jejunums konnte vermehrt eine negative bis schwach positive, kaum aber eine starke Immunreaktion ausgemacht werden (Abb. 13).

Schwächer als die beiden proximalen Dünndarmabschnitte waren die Kerne der Enterozyten im Ileum durchschnittlich grau bis hellbraun, also sehr schwach bis

schwach positiv gefärbt (Abb. 14). Dabei unterschieden sich die der Tela submucosa (siehe 4.1.2) angrenzenden Drüsenepithelzellen mit einer negativen bis sehr schwach positiven Kernfärbung von den übrigen etwas stärker gefärbten Epithelzellen der Drüsenschicht.

Das Oberflächenepithel aller Dünndarmabschnitte wies eine schwach positive Reaktion in der unteren Hälfte der Zotten auf, die zur Spitze hin in eine schwache bis sehr schwach positive Kernfärbung überging.

Die stärkste Immunreaktion aller Darmabschnitte war im Drüsenepithel des Caecums vorzufinden. Die Enterozyten waren mehrheitlich von mittelstarker Braunfärbung. Daneben waren zunehmend negativ reagierende Becherzellen und vereinzelte schwach bis sehr schwach gefärbte Enterozytenkerne zu finden (Abb. 15).

Das Colon wies – wie auch das Ileum – eine sehr schwache Farbreaktion auf. Die Kerne der im Colon sehr zahlreich vorliegenden Becherzellen waren blau, also nicht spezifisch (negativ) gefärbt und die Enterozytenzellkerne wiesen eine graue bis maximal beige Färbung auf (Abb. 16).

Im Oberflächenepithel beider Dickdarmabschnitte – Caecum und Colon – war nur eine schwache bis sehr schwache Immunreaktion festzustellen. Neben zahlreichen grauen und nicht angefärbten, blauen Zellkernen lagen nur vereinzelte beige angefärbte Kerne vor.

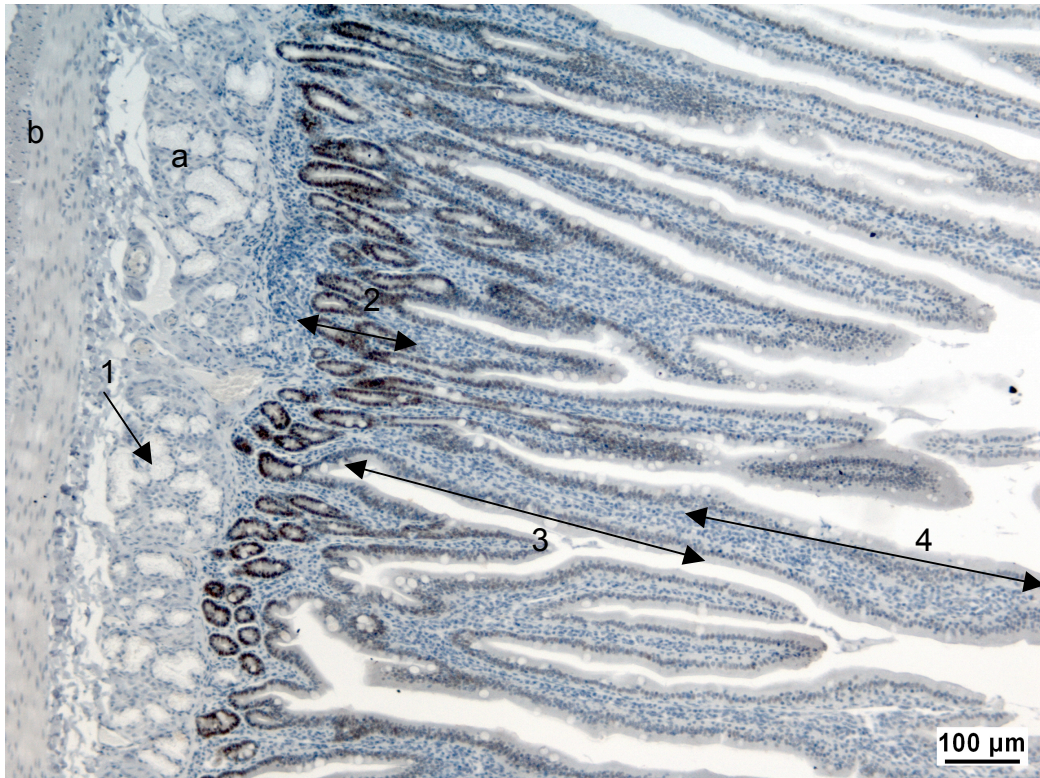


Abb. 12: Immunhistochemischer Nachweis von VDR im Duodenum  
 1 Brunner-Drüsen der Tela submucosa; 2 Drüsenepithel;  
 3 Oberflächenepithel, basal; 4 Oberflächenepithel, apikal  
 a Tela submucosa; b Tunica muscularis



Abb. 13: Immunhistochemischer Nachweis von VDR im Jejunum  
 1 Drüsenepithel; 2 Oberflächenepithel, basal; 3 Oberflächenepithel, apikal  
 a Tela submucosa; b Tunica muscularis



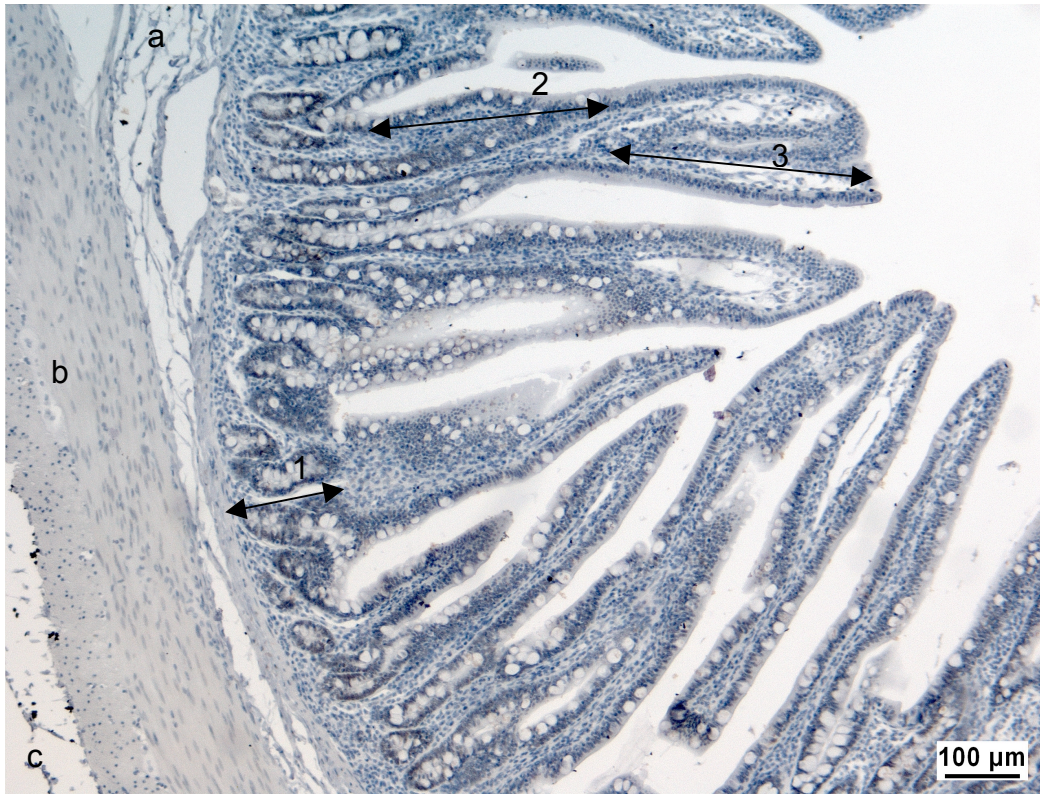


Abb. 14: Immunhistochemischer Nachweis von VDR im Ileum  
1 Drüsenepithel; 2 Oberflächenepithel, basal; 3 Oberflächenepithel, apikal  
a Tela submucosa; b Tunica muscularis; c Tunica serosa

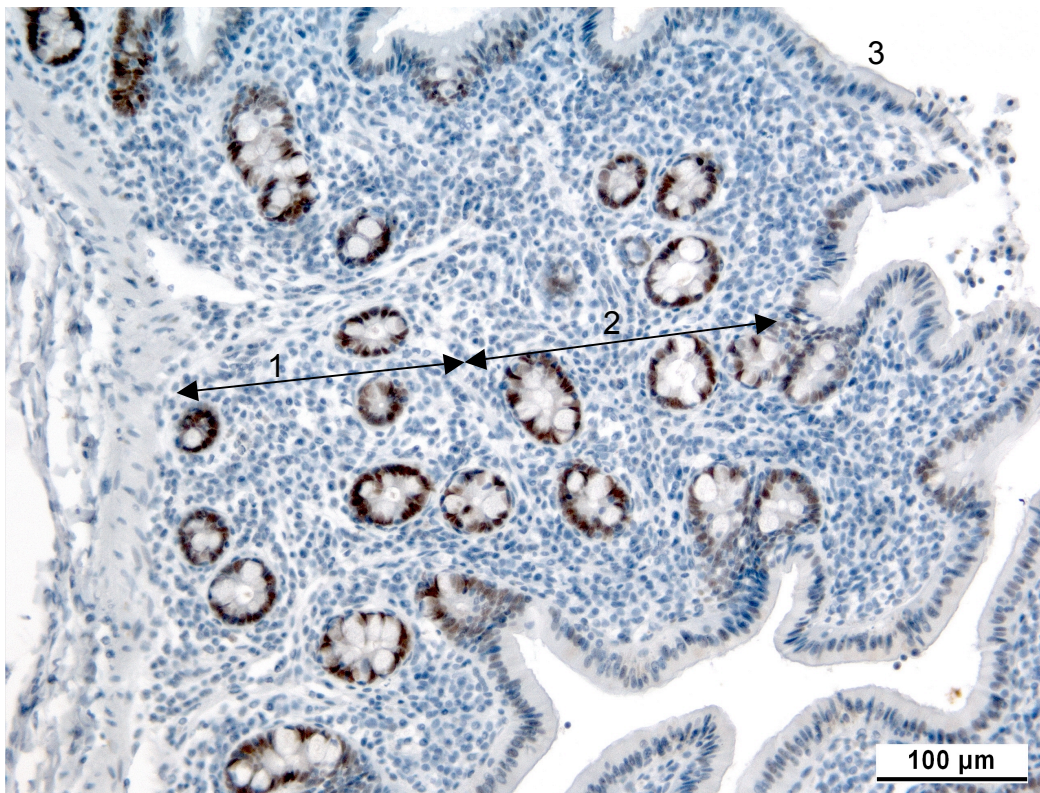


Abb. 15: Immunhistochemischer Nachweis von VDR im Caecum  
1 Drüsenepithel, basal; 2 Drüsenepithel, apikal; 3 Oberflächenepithel



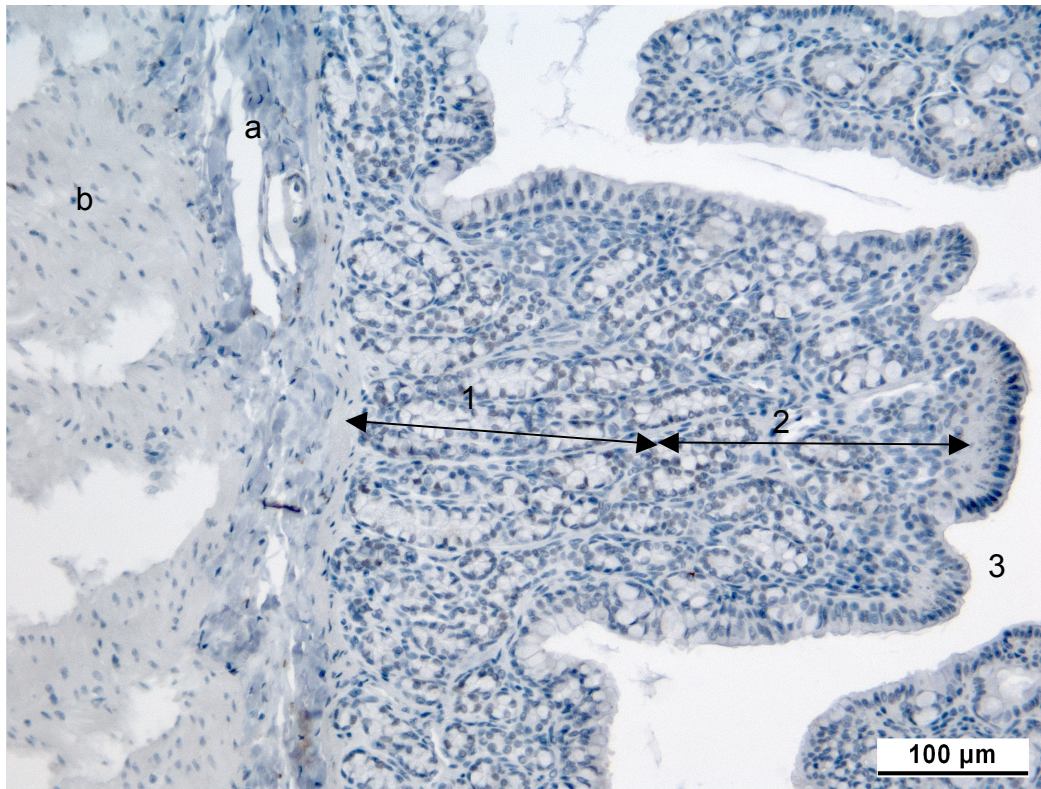


Abb. 16: Immunhistochemischer Nachweis von VDR im Colon  
1 Drüsenepithel, basal; 2 Drüsenepithel, apikal; 3 Oberflächenepithel  
a Tela submucosa; b Tunica muscularis

### 6.1.2 Vergleich der vier Gruppen

Werden die kumulativen IRS der einzelnen Darmabschnitte der vier unterschiedlich gefütterten Gruppen L, G, LG und GG (Tab. 10) miteinander verglichen, so ist keine einheitliche Gruppen-Reihenfolge festzustellen (Tab. 4). Bei den Gruppen G (Gras) und GG (Grasmehl/Getreide) war der immunhistochemische Nachweis des VDR häufig weniger stark ausgeprägt als bei den Gruppen L (Luzerne) und LG (Luzerne/Getreide).

Bei einem Vergleich der untersuchten Darmabschnitte lagen, mit Ausnahme des Caecums ( $p = 0,032$ ; Tab. 4), keine signifikanten Gruppenunterschiede vor ( $p > 0,05$ ).

Tabelle 4: Vergleich der kumulativen IRS der verschiedenen Fütterungsgruppen in Abhängigkeit vom Darmabschnitt

Darmabschnitt	Gruppenvergleich	p-Wert
Duodenum	L > GG > LG > G	0,146
Jejunum	L > GG > LG > G	0,359
Ileum	LG > L > G > GG	0,660
Caecum	LG > G > L > GG	<b>0,032</b>
Colon	L > G > LG > GG	0,101

L: Fütterungsgruppe 'Luzerne'; G: Fütterungsgruppe 'Gras'; LG: Fütterungsgruppe 'Luzerne & Getreide'; GG: Fütterungsgruppe 'Grasmehl & Getreide'

Im Gruppenvergleich der einzelnen Schichten (Drüsen- und Oberflächenepithel) lag einzig im Drüsenepithel des Caecums ein signifikanter Unterschied vor. Der Epithelabschnitt DrEp basal mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p = 0,015$  zeigte eine Signifikanz zwischen den vier Gruppen auf. Die Gruppe LG unterschied sich im basalen Drüsenepithel (DrEP basal) signifikant von den Gruppen L, G und GG (Tab. 5). Im apikalen Abschnitt des Drüsenepithels ( $p = 0,098$ ) bestand einzig zwischen den Gruppen LG und GG ein statistisch signifikanter Unterschied mit  $p = 0,037$ . Im Oberflächenepithel (ObEp) konnten keine Gruppenunterschiede verifiziert werden ( $p > 0,05$ ).

Tabelle 5: Vergleich des IRS der verschiedenen Epithelabschnitte des Caecums in Abhängigkeit von der Fütterungsgruppe

Fütterungsgruppe	DrEp basal p-Wert	DrEp apikal p-Wert	ObEp p-Wert
L ↔ G	0,522	0,423	0,873
L ↔ <b>LG</b>	<b>0,025</b>	0,078	0,522
L ↔ GG	0,522	0,522	0,337
G ↔ <b>LG</b>	<b>0,037</b>	0,337	0,423
G ↔ GG	0,078	0,092	0,337
<b>LG</b> ↔ GG	<b>0,006</b>	<b>0,037</b>	0,078

L: Fütterungsgruppe 'Luzerne'; G: Fütterungsgruppe 'Gras'; LG: Fütterungsgruppe 'Luzerne & Getreide'; GG: Fütterungsgruppe 'Grasmehl & Getreide'

### 6.1.3 Vergleich der einzelnen Darmabschnitte

Die fünf untersuchten Darmabschnitte – Duodenum, Jejunum, Ileum, Caecum und Colon – wiesen alle eine VDR-Immunreaktion auf (Abb. 17).

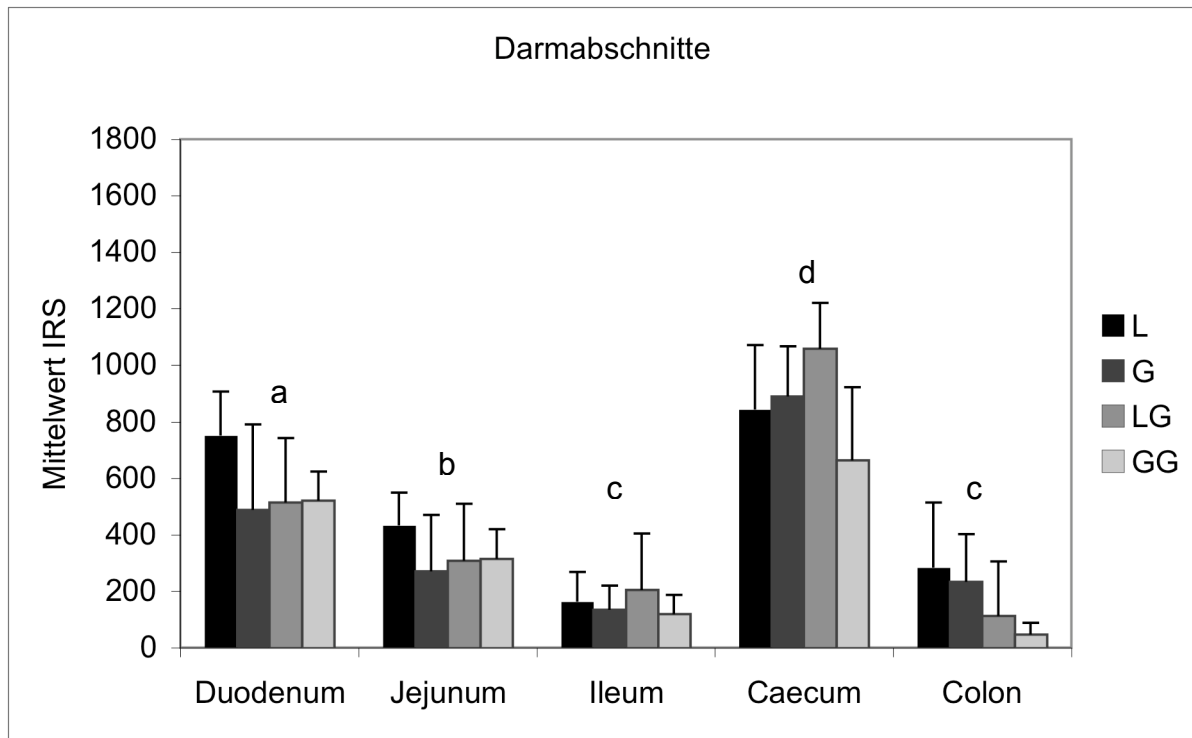


Abb. 17: Graphische Darstellung des mittleren kumulativen VDR-IRS der einzelnen Darmabschnitte in Abhängigkeit von der Fütterung  
 L: Fütterungsgruppe 'Luzerne'; G: Fütterungsgruppe 'Gras';  
 LG: Fütterungsgruppe 'Luzerne & Getreide'; GG: Fütterungsgruppe 'Grasmehl & Getreide'  
 a, b, c, d = signifikant

Die durchschnittliche immunhistochemische Anfärbung der Zellkerne war im Caecum am stärksten ausgeprägt und lag im Bereich einer mittelstark positiven Zellkernfärbung (IRS-Mittelwert = 863) (Tab. 11). Im selben Bereich, jedoch mit einem tieferen IRS-Mittelwert lag das Duodenum (IRS-Mittelwert = 568). Dem Jejunum mit einer schwach positiven durchschnittlichen Kernfärbung (IRS-Mittelwert = 331) folgte das Colon (IRS-Mittelwert = 169) und das Ileum mit der geringsten immunologischen Reaktion (IRS-Mittelwert = 155). Es konnte folgende IRS-Reihenfolge der Darmabschnitte mit jeweils abgestufter Immunreaktivität festgestellt werden: Caecum > Duodenum > Jejunum > Colon = Ileum.



Sämtliche Darmabschnitte wiesen signifikante Unterschiede zueinander auf ( $p = 0,007$ ; Tab. 6). Eine Ausnahme bilden die Abschnitte Ileum und Colon, die sich bei einer Gegenüberstellung keine deutlichen Differenzen aufweisen ( $p = 0,841$ ).

Tabelle 6: Statistische Wahrscheinlichkeit der Differenz des kumulativen IRS zwischen den einzelnen Darmabschnitten Duodenum, Jejunum, Ileum, Caecum und Colon

Darmabschnitt	Irrtumswahrscheinlichkeit
Duodenum ↔ Jejunum	$p < 0,001$
Duodenum ↔ Ileum	$p < 0,001$
Duodenum ↔ Caecum	$p < 0,001$
Duodenum ↔ Colon	$p < 0,001$
Jejunum ↔ Ileum	$p < 0,001$
Jejunum ↔ Caecum	$p < 0,001$
Jejunum ↔ Colon	$p = 0,001$
Ileum ↔ Caecum	$p < 0,001$
Ileum ↔ Colon	$p = 0,841$
Caecum ↔ Colon	$p < 0,001$

Die deutlichsten Unterschiede in der immunhistochemischen Reaktivität waren zwischen den Abschnitten Caecum und Colon ( $\times 2,965$ ) und zwischen Duodenum und Colon ( $\times 2,639$ ) zu finden (Tab. 12). Mit einem Faktor von  $\times 1,107$  war zwischen den Abschnitten Ileum und Colon die geringste Differenz der kumulativen Zellkernfärbung zu beobachten.

### 6.1.4 Vergleich der einzelnen Epithelabschnitte

In allen Darmabschnitten, sowohl im Dünn- wie auch im Dickdarm waren jeweils zwischen den einzelnen Drüsenepithelabschnitten und dem entsprechenden Oberflächenepithel statistisch signifikante Unterschiede in der Immunreaktion zu sehen ( $p < 0,001$ ). In den Dünndarmabschnitten Duodenum, Jejunum und Ileum lagen bei einem jeweiligen Vergleich der einzelnen Abschnitte – DrEp basal, DrEp apikal und ObEp – signifikante Färbungsunterschiede vor ( $p < 0,001$ ; Abb. 18, 19, 20).

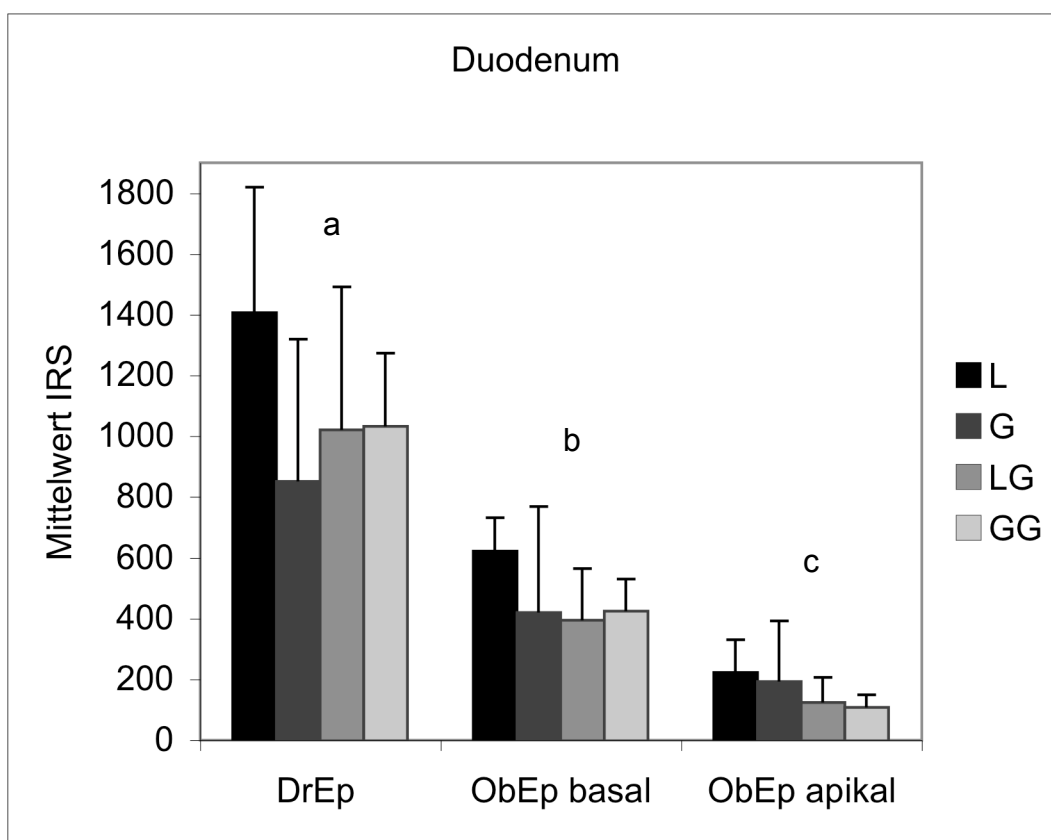


Abb. 18: Graphische Darstellung des mittleren kumulativen VDR-IRS des Duodenums in Abhängigkeit vom Epithelabschnitt und von der Fütterung.  
 L: Fütterungsgruppe 'Luzerne'; G: Fütterungsgruppe 'Gras';  
 LG: Fütterungsgruppe 'Luzerne & Getreide'; GG: Fütterungsgruppe 'Grasmehl & Getreide'  
 a, b, c = signifikant

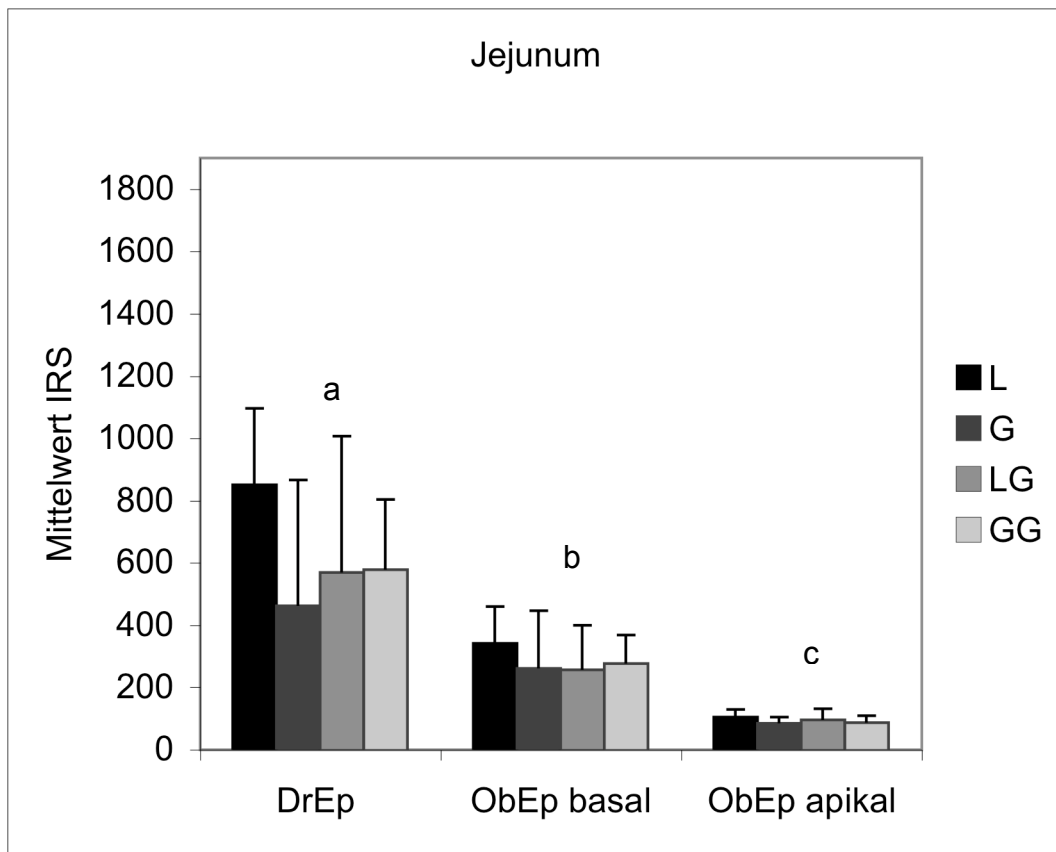


Abb. 19: Graphische Darstellung des mittleren kumulativen VDR-IRS des Jejunums in Abhängigkeit vom Epithelabschnitt und von der Fütterung  
 L: Fütterungsgruppe 'Luzerne'; G: Fütterungsgruppe 'Gras';  
 LG: Fütterungsgruppe 'Luzerne & Getreide'; GG: Fütterungsgruppe 'Grasmehl & Getreide'  
 a, b, c = signifikant

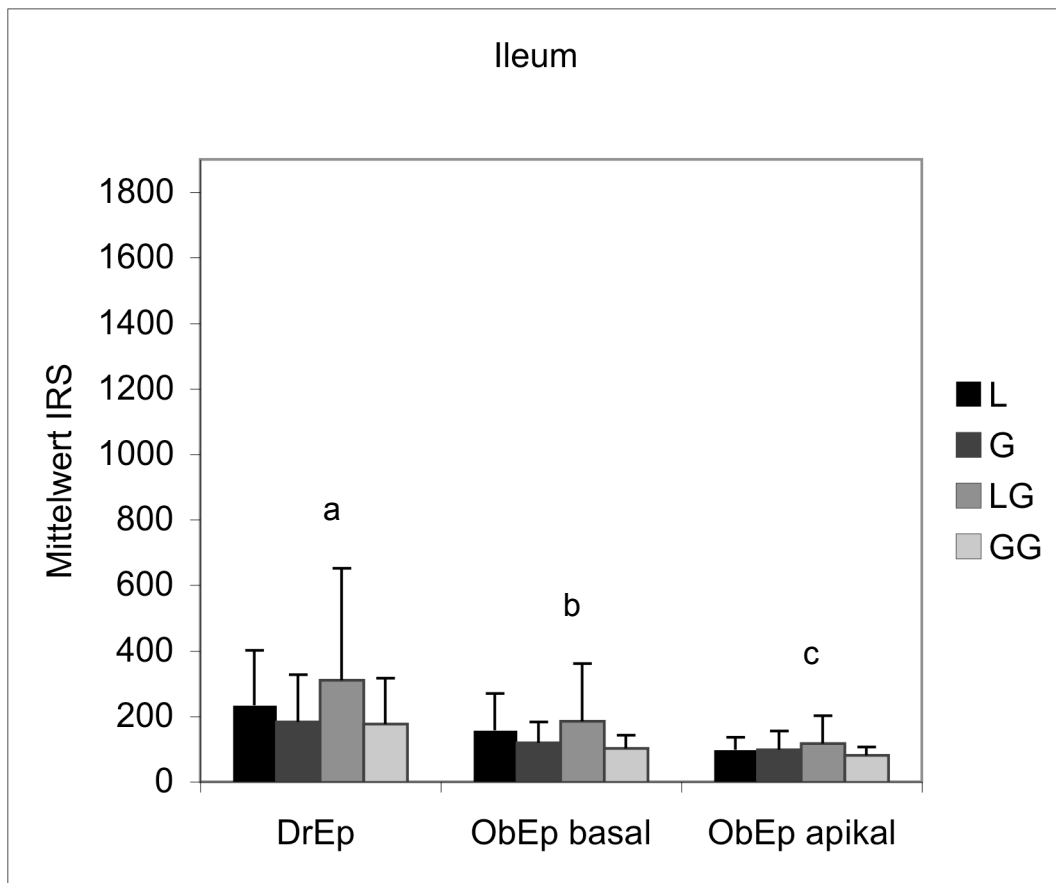


Abb. 20: Graphische Darstellung des mittleren kumulativen VDR-IRS des Ileums in Abhängigkeit vom Epithelabschnitt und von der Fütterung  
 L: Fütterungsgruppe 'Luzerne'; G: Fütterungsgruppe 'Gras';  
 LG: Fütterungsgruppe 'Luzerne & Getreide'; GG: Fütterungsgruppe 'Grasmehl & Getreide'  
 a, b, c = signifikant

Die prozentuale Verteilung der VDR im Dünndarm lag im Durchschnitt bei mehr als 49 % im Drüsenepithel (DrEp), im Vergleich zu etwa 30 % im basalen Oberflächenepithel (ObEp basal) und durchschnittlichen 13 % im Oberflächenepithel an den Zottenspitzen (ObEp apikal; Abb. 21).

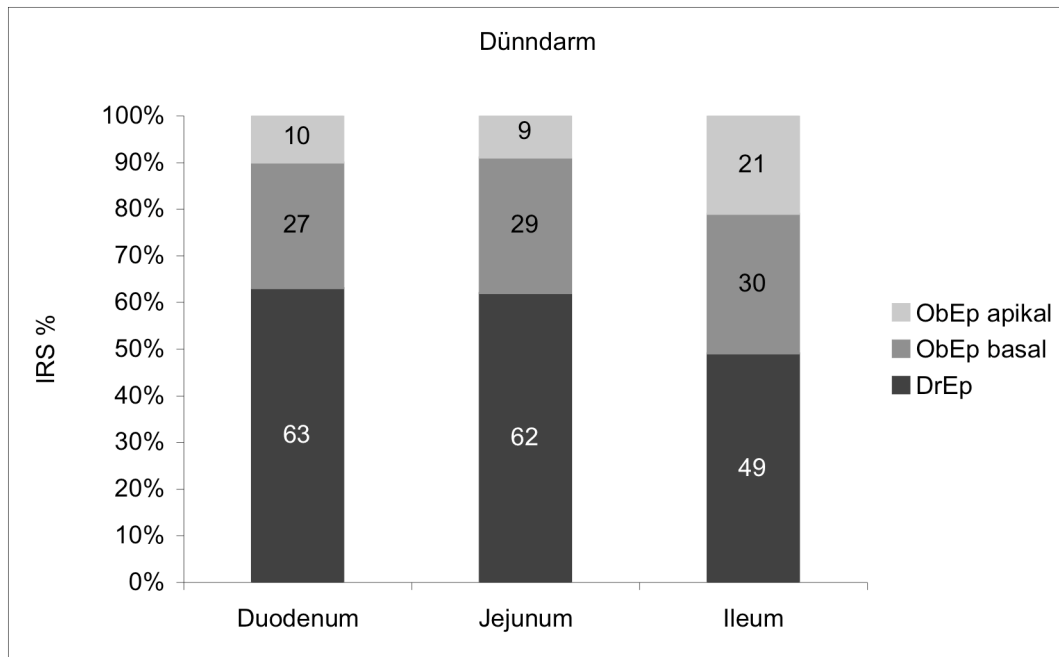


Abb. 21: Prozentuale Verteilung der VDR zwischen den Epithelabschnitten in Abhängigkeit vom Dünndarmabschnitt

Die statistische Auswertung der einzelnen Caecumausschnitte zeigte bei allen dreien signifikante Unterschiede zueinander auf ( $p < 0,001$ ; Abb. 22). Dies entsprach den ausgewerteten Ausschnitten der Dünndarmabschnitte.

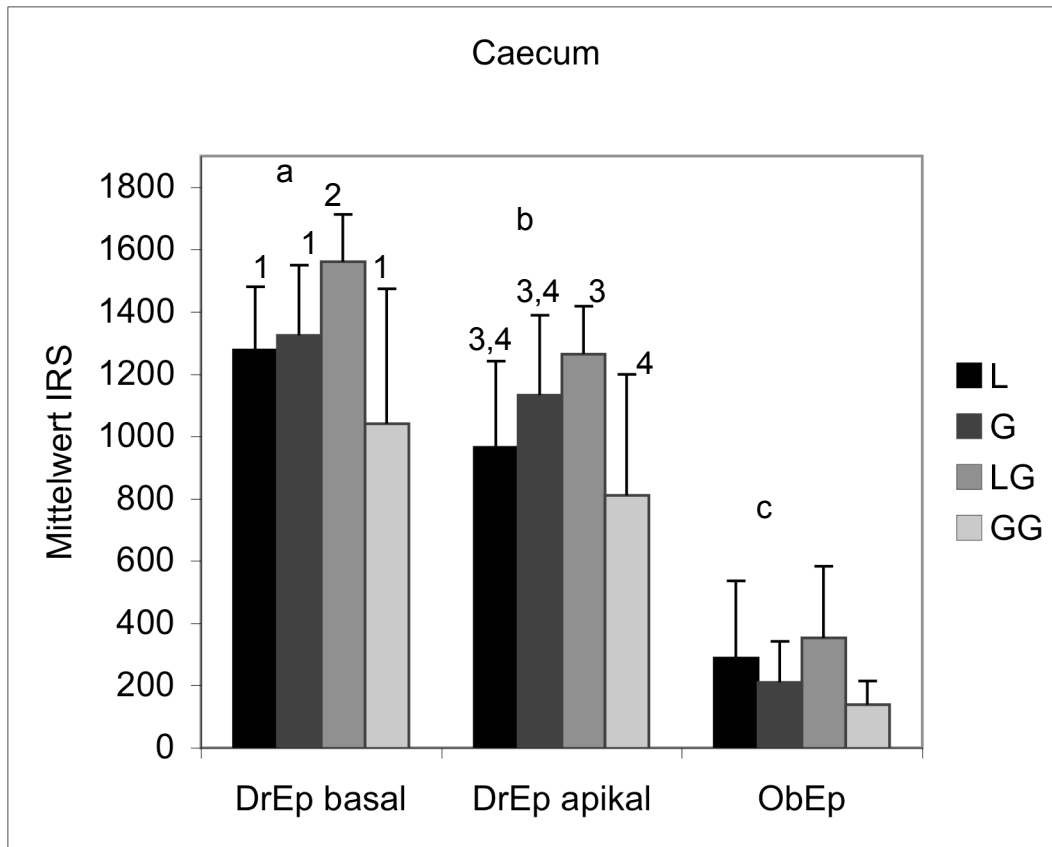


Abb. 22: Graphische Darstellung des mittleren kumulativen VDR-IRS des Caecums in Abhängigkeit vom Epithelabschnitt und von der Fütterung  
 L: Fütterungsgruppe 'Luzerne'; G: Fütterungsgruppe 'Gras';  
 LG: Fütterungsgruppe 'Luzerne & Getreide'; GG: Fütterungsgruppe 'Grasmehl & Getreide'  
 a, b, c = signifikant; 1 < 2 sowie 3 > 4

Zwischen den drei Ausschnitten des Colons bestand keine einheitliche Signifikanz (Abb. 23). So konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Ausschnitten DrEp basal und apikal ausgemacht werden ( $p = 0,099$ ). In einer Gegenüberstellung der Ausschnitte DrEp basal und ObEp ( $p = 0,003$ ) sowie DrEp apikal und ObEp ( $p < 0,001$ ) lagen jedoch, ähnlich der übrigen Darmabschnitte Duodenum, Jejunum, Ileum und Caecum, statistisch signifikante Unterschiede vor.

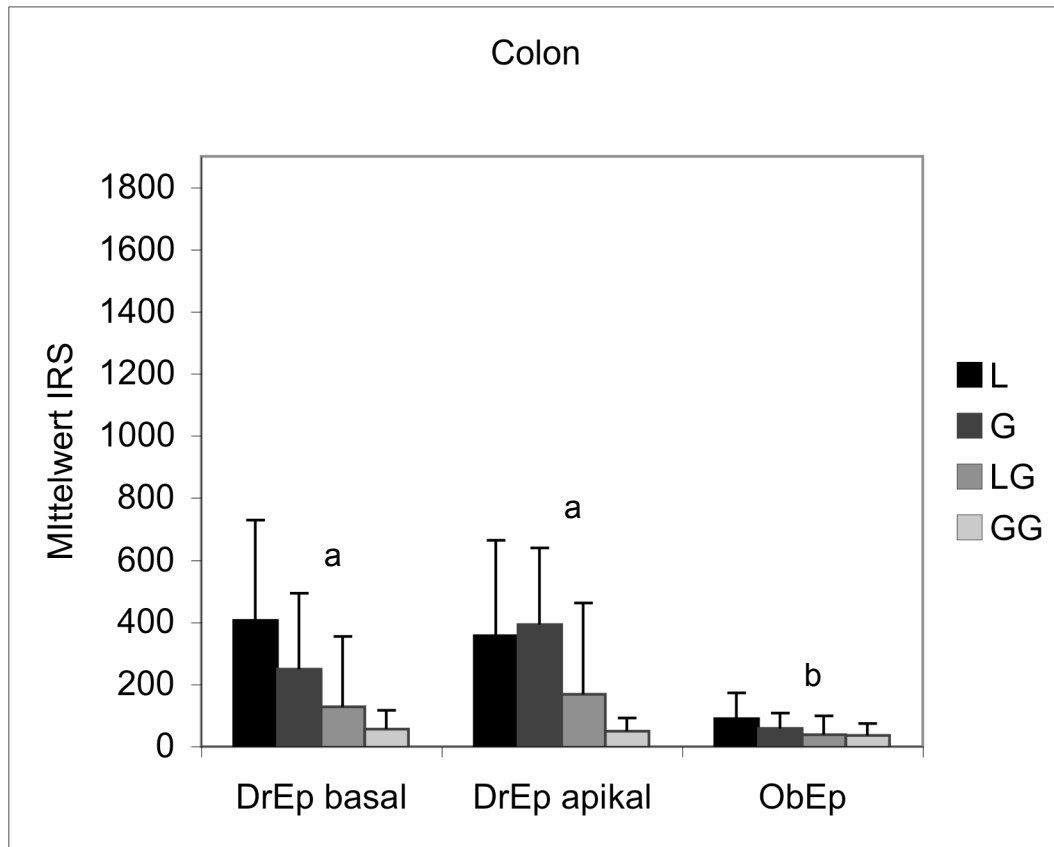


Abb. 23: Graphische Darstellung des mittleren kumulativen VDR-IRS des Colons in Abhängigkeit vom Epithelabschnitt und von der Fütterung  
 L: Fütterungsgruppe 'Luzerne'; G: Fütterungsgruppe 'Gras';  
 LG: Fütterungsgruppe 'Luzerne & Getreide'; GG: Fütterungsgruppe 'Grasmehl & Getreide'  
 a, b = signifikant

Im Dickdarm lag der prozentuale Anteil der VDR in beiden Drüsenepithelabschnitten (DrEp basal, apikal) der, im Gegensatz zum Dünndarm morphologisch breiteren Drüsenschicht bei mehr als 40 %. Im Oberflächenepithel (ObEp) betrug die Rezeptorenmenge etwa 10 % (Abb. 24).

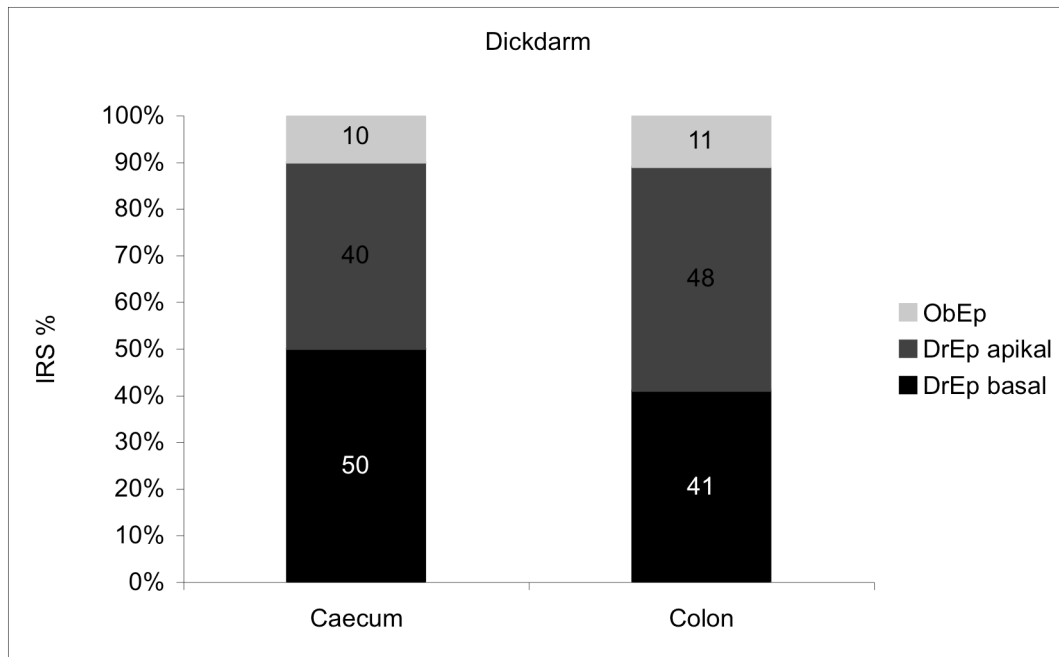


Abb. 24: Prozentuale Verteilung der VDR zwischen den Epithelabschnitten in Abhängigkeit vom Dickdarmabschnitt



## **7 Diskussion**

Das Ziel dieser Arbeit war es, mittels immunhistochemischer Färbung einen Einblick in das Vorkommen und die Verteilung von Vitamin D-Rezeptoren (VDR) in verschiedenen Darmabschnitten von Kaninchen zu erhalten. Des Weiteren stellte sich die Frage, ob die Anzahl und die Verteilung der VDR mit dem Calcium- und Phosphorgehalt der Ration im Zusammenhang stehen. Die Dissertationen von Riner (2006) und Singer (2006), in denen unter anderem die Verteilung der VDR im Verdauungstrakt von Schafen und Ziegen bzw. Kühen untersucht wurden, dienten der hier vorliegenden Studie als Vorbild für die Untersuchung der VDR im Darmtrakt von Kaninchen. Es galt herauszufinden, ob im Verteilungsmuster der Rezeptoren im Darmkanal Unterschiede zwischen den Wiederkäuern als Vormagenverdauer und den Kaninchen als Dickdarmverdauer vorliegen.

### **7.1 Probenmaterial und Auswertung**

Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, sind ein einheitlicher Versuchsaufbau sowie eine einheitliche Probenaufarbeitung essentiell. Die Darmproben entstammten von gesunden, fünf bis sechs Monate alten Tieren beider Geschlechter, die, mit Ausnahme der im Versuchsaufbau vorgesehenen unterschiedlichen Futterzusammensetzung, unter einheitlichen Bedingungen gehalten worden waren. Wie der Versuchsaufbau wurden die Verarbeitung des Materials sowie die Auswertung der gewonnenen Resultate jeweils von einer Person unter möglichst identischen Bedingungen ausgeführt.

Die herangezogene immunhistochemische Färbemethode für den Nachweis von VDR hat gegenüber biochemischen Verfahren den Vorteil, die Rezeptoren innerhalb des Gewebes genau lokalisieren und einzelnen Zellen zuordnen zu können. Allfällig auftretende Fehlerquellen, die durch Interassay-Variationen der wiederholt durchgeführten immunhistochemischen Reaktionen, wie auch durch die visuelle, von der zu untersuchenden Person abhängigen Bestimmung der Farbintensität immunpositiver Zellkerne entstehen können, wurden in der vorliegenden Arbeit mittels zufälliger Auswahl der Zellen bzw. der mikroskopischen Felder für die Erhebung der IRS-Mittelwerte in Grenzen gehalten.

Der Nachweis der VDR im Darm von Kaninchen erfolgte nach dem von Riner et al. (2008) bei Wiederkäuern angewandten immunhistochemischen Protokoll für die Variation der ABC-Methode (5.3.1.1). Der dabei verwendete monoklonale VDR-Antikörper 9A7 $\gamma$  wies in mehreren vorangegangenen Studien eine gute Kreuzreaktivität mit dem VDR von Wiederkäuern (Singer, 2006; Riner et al., 2007), und Menschen (Berger et al., 1988; Reichrath et al., 2000) auf, ohne Reaktionen mit anderen Rezeptoren – wie Östrogen- oder Glucocorticoidrezeptoren – aufzuzeigen (Haussler, 1986).

Im Vorfeld der immunhistochemischen Hauptversuche wurden mehrere Vorversuche zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit sowie der Spezifität des verwendeten Antikörpers durchgeführt. Um die Wahrhaftigkeit der Resultate zu gewährleisten, wurden in jedem Versuch, neben den zu untersuchenden Darmproben, positive und negative Proben mitgeführt. In den negativen Kontrollen diente das non-immune-Serum als Ersatz für den Primärantikörper. Dadurch konnten bei einem späteren Vergleich der Positiv- und Negativkontrollen spezifische Immunreaktionen von unspezifischen Anfärbungen unterschieden werden.

## **7.2 Nachweis des Vitamin D-Rezeptors**

Vitamin D spielt für die Regulation des Calcium-Stoffwechsels eine essentielle Rolle, indem seine biologisch aktive Form – das Calcitriol – durch die Bindung an den zellulären Vitamin D-Rezeptor (VDR) die aktive Ca-Absorption steuert (Dusso et al., 2005). Mit der Eigenschaft eines ligand-aktivierten Transkriptionsfaktors steigert der VDR die Syntheserate einiger, für die transepitheliale Ca-Aufnahme bedeutsamen Proteine wie Calbindin-D<sub>9k</sub> und Calbindin-D<sub>28k</sub> (Bronner, 2003) oder die Ca-Kanäle TRPV5 und TRPV6 (Hoenderop et al., 2005).

Mittels immunhistochemischem Nachweis konnte in allen, im Rahmen vorliegender Studie untersuchten Darmabschnitten – Duodenum, Jejunum, Ileum, Caecum und Colon – VDR in den Enterozytenkernen nachgewiesen werden.

Die Menge immunhistochemisch darstellbarer VDR unterschied sich in den einzelnen Darmabschnitten signifikant. Aus den vorliegenden Resultaten ergab sich folgendes VDR-Verteilungsmuster: Caecum > Duodenum > Jejunum > Colon > Ileum.

In den Arbeiten von Riner (2006), Singer (2006), Boos et al. (2007) sowie Riner et al. (2008) wurde in den Dünndarmabschnitten ein vergleichbares Verteilungsmuster beobachtet. Die stärkste Immunreaktion bezüglich VDR war sowohl bei Kühen als auch bei Schafen und Ziegen im Duodenum zu sehen. In beiden Studien führte der immunhistochemische Nachweis des VDR im Darm zu folgender Reihenfolge der untersuchten Darmabschnitte bezüglich der Verteilung des Rezeptors: Duodenum > Jejunum > Ileum, Caecum, Colon. Bei den Kühen, wie auch bei den Schafen und Ziegen, nahm die Menge immunhistochemisch nachgewiesener VDR im Darmkanal vom proximalen Dünndarm zum Dickdarm hin ab.

Innerhalb des Dünndarms von Kaninchen zeichnete sich ein, mit den von Riner (2006), Singer (2006), Boos et al. (2007) und Riner et al. (2008) untersuchten Wiederkäuern, vergleichbares Bild ab. Die Abschnitte Duodenum, Jejunum und Ileum unterschieden sich jeweils signifikant voneinander, in der Reihenfolge Duodenum > Jejunum > Ileum.

Entgegen den Erwartungen aus früheren Studien über die aktive Ca-Resorption (Bronner, 1987; Hoenderop et al., 1999; Bronner, 2003) und die Lokalisation der VDR im Darm (Rougui et al., 1998; Singer, 2006; Boos et al., 2007; Riner et al., 2008) wies beim Kaninchen das Caecum die stärkste Immunreaktion auf ( $p < 0,05$ ; Mittelwert des kumulativen IRS: 863), die im Mittel um den Faktor 1,5 stärker war als im Duodenum (Mittelwert des kumulativen IRS: 568).

Während bei den meisten Säugetieren das mit der Nahrung aufgenommene Calcium über den aktiven, Vitamin D-abhängigen Mechanismus und bei erhöhtem Ca-Angebot über die passive Diffusion entlang des Calcium-Konzentrationsgradienten zwischen dem Blut und dem Darmlumen erfolgt (Haussler, 1986; Bronner, 1987; Haussler et al., 1998; Dusso et al., 2005), überwiegt beim Kaninchen und weiteren Dickdarmverdauern die effiziente, passive Ca-Aufnahme (Eckermann-Ross, 2008). Die aktive, transzelluläre Ca-Absorption im Darm läuft vorwiegend im proximalen Dünndarm ab und hängt sowohl von der Konzentration verfügbaren Calciums im Darmlumen als auch vom Bedarf des Organismus ab (Barley et al., 2000; Bronner, 2003; Hoenderop et al., 2005). Die höchste Konzentration von VDR ist demnach im proximalen Dünndarm zu erwarten, was bei Wiederkäuern von Riner (2006), Singer (2006), Boos et al. (2007) sowie Riner et al. (2008) bestätigt wurde. Im Dünndarm

von Kaninchen war der Gehalt an VDR in den proximalen Abschnitten ebenfalls am grössten.

Im Dickdarm wird unter normalen Bedingungen, d.h. wenn keine Mangelversorgung des Mineralstoffes vorliegt, von den meisten Säugetieren nur wenig Calcium aufgenommen (Schryver et al., 1974; Hintz et al., 1978; Kamphues, 1991; Redrobe, 2002; Eckermann-Ross, 2008). Beim Kaninchen jedoch deuten die aus vorliegender Studie nachgewiesenen, sehr hohen Konzentrationen an VDR im Caecumepithel auf einen nicht unwesentlichen transzellulären Ca-Absorptionsvorgang in diesem Darmabschnitt. Möglicherweise wird im Caecum das, nach der Ca-Resorption im Dünndarm, im Chymus in noch geringen Konzentrationen verbleibende Calcium aktiv, transzellulär absorbiert. Um dies zu verifizieren, sind in künftigen Untersuchungen die durch Calcitriol induzierten Parameter der aktiven Ca-Resorption – Calbindin-D<sub>9k</sub>, Calbindin-D<sub>28k</sub>, TRVP5 und TRVP6 – das Ziel.

Durch Studien über den Ionentransport im Caecum von Kaninchen ist bekannt, dass diese Tierart in diesem Darmabschnitt über eine sehr hohe aktive Elektrolyttransportkapazität verfügt, bedingt durch ein dichtes Epithel mit einem hohen transepithelialen Potential und einem relativ hohen parazellulären Widerstand (Leng, 1978; Clauss et al., 1987; Clauss et al., 1989).

Bei den Untersuchungen über die Ionenströme am Caecumepithel durch Clauss et al. (1989) wurde der transzelluläre Ca<sup>2+</sup>-Transport zwar nicht mitberücksichtigt, doch geben die Resultate über die Natrium-, Rubidium- sowie Chloridionen einen Hinweis auf eine mögliche Absorption auch von Ca-Ionen in diesem Darmabschnitt.

In einer Studie über die intestinale Expression der Transkripte der Plasmamembran-Ca-Pumpe (PMCA1) beim Kaninchen (Freeman et al., 1995), korreliert des weiteren das Vorkommen der Ca-Pumpen im Dünndarm mit der Lokalisation der aktiven, transzellulären Ca-Absorption. Mittels Northern blot und In situ-Hybridisierung wurden sowohl im Dünndarm als auch im Dickdarm in den proximalen Regionen eine viel grössere Anzahl PMCA1-Transkripte nachgewiesen als in den distalen Dün- bzw. Dickdarmabschnitten. Diese Beobachtungen geben einen weiteren Hinweis auf eine mögliche Lokalisation der transzellulären Ca-Absorption im Darm von Kaninchen. Zudem entspricht die Verteilung der PMCA1 in den verschiedenen Darmabschnitten

aus der Studie von Freeman et al. (1995) dem, im Rahmen vorliegender Untersuchung ermittelten VDR-Verteilungsmuster.

Die Rationsgestaltung war ein zusätzlicher Parameter der vorliegenden Arbeit bezüglich der VDR-Expression im Kaninchendarm. Die durch das Institut für Tierernährung der Vetsuisse-Fakultät der Universität Zürich durchgeführte Analyse der im Rahmen vorliegender Studie verwendeten Futtermittel ergibt für das Luzerneheu (L; Ca-Gehalt: 2,32 %) ein Ca:P-Verhältnis von 8:1 (Tab. 7) und aus der Kombination der Futtermittel Luzerne und Getreide (LG; Ca-Gehalt: 1,36 %) resultiert ein Ca:P-Verhältnis von 3,8:1. Der Ca-Gehalt wie auch das Ca:P-Verhältnis der beiden Futtermittel Gras (G; Ca-Gehalt: 0,54 %) sowie Grasmehl und Getreide (GG; Ca-Gehalt: 0,83 %) waren hingegen bedeutend kleiner – 1,91:1 bzw. 1,79:1.

Aus dem Vergleich der kumulativen IRS der verschiedenen Fütterungsgruppen in Abhängigkeit vom Darmabschnitt ging hervor, dass die mit Luzerneheu oder mit Luzerneheu und Getreide gefütterten Gruppen – die Gruppen L und LG – im Gegensatz zu den beiden anderen Gruppen – G und GG – in allen Darmabschnitten eine höhere Anzahl immunhistochemisch darstellbarer VDR im Epithel aufwiesen (Tab. 4), signifikante Unterschiede in der VDR-Menge jedoch nur im Drüsenepithel des Caecums der Gruppe LG, im Vergleich mit den übrigen Gruppen, vorlagen.

Eine mögliche Erklärung für den erhöhten Gehalt an VDR in den Darmabschnitten der Gruppen L und LG könnte sowohl im sehr Ca-reichen Luzerneheu als auch im P-haltigen Getreide liegen, da in vielen Ca-haltigen Pflanzen (Ca-Gehalt > 1,35 %) signifikante Oxalat-Level zu finden sind, an welche gebundenes Calcium – als Ca-Oxalat – von Kaninchen nicht absorbiert werden kann (Redrobe, 2002).

Daher könnten die in dieser Studie mit Luzerneheu gefütterten Kaninchen ihren hohen, physiologischen Ca-Bedarf möglicherweise durch eine vermehrte aktive transzelluläre Ca-Absorption im Darm abdecken, was die erhöhte Anzahl VDR in den verschiedenen Darmabschnitten dieser beiden Gruppen L und LG vermuten lassen würde.

Allerdings geht aus der Studie von Centeno et al. (2004) hervor, dass bei einer Ca-Unterversorgung die transzelluläre Ca-Aufnahme im Darm zwar gesteigert wird, die Menge VDR in den Enterozyten jedoch abnimmt. Bei hohen Ca-Gehalten in der Nahrung wiederum ist die VDR-Expression in denselben Zellen erhöht. Daher könnte die grosse Anzahl VDR in den Enterozyten der mit Luzerneheu bzw. -mehl

gefütterten Kaninchen eher auf den hohen Ca-Gehalt dieser Futtermittel zurückzuführen sein – Ca-Gehalt 1,36-2,32 %.

Zwischen den drei ausgewerteten Epithelausschnitten – im Dünndarm das Drüsenepithel und das basale sowie apikale Oberflächenepithel, im Dickdarm das basale sowie apikale Drüsenepithel und das Oberflächenepithel – innerhalb eines Darmabschnittes lagen bei allen Tieren signifikante Unterschiede vor.

Die Enterozytenkerne im Drüsenepithel der einzelnen Dünndarmabschnitte waren einheitlich gefärbt. Es waren keine Änderungen der Färbintensität der Enterozytenzellkernen zwischen den getrennt ausgewerteten basalen bzw. apikalen Drüsenabschnitten festzustellen. Im Drüsenepithel der Dickdarmabschnitte konnten hingegen im apikalen Abschnitt leicht abgeschwächte Farbreaktionen der Zellkerne im Vergleich zu den basalen Drüsenregionen beobachtet werden. In allen Darmabschnitten wies das Drüsenepithel jeweils eine signifikant stärkere Immunreaktion auf als das Oberflächenepithel. Ähnliche Resultate beobachteten Singer (2006) in den verschiedenen Darmabschnitten von Kühen sowie Riner (2006) bei Schaf- und Ziegendärmen. In vorliegender Studie wies das Oberflächenepithel der Dünndarmabschnitte einen signifikanten Färbeunterschied der Enterozytenkerne zwischen der Zottenbasis, dem Mündungsbereich der Krypten und der Zottenspitze auf. In den Dickdarmabschnitten Caecum und Colon war das zottenfreie Oberflächenepithel dagegen einheitlich sehr schwach gefärbt.

Die stärkste Immunreaktion war beim Kaninchen im Drüsenepithel des Caecums zu beobachten, die womöglich mit der bereits erwähnten, besonderen Bedeutung des Caecums sowie dem, im Vergleich zu anderen Tierarten, besonderen Ca-Stoffwechsel dieser Tierart einhergeht (Redrobe, 2002).

Eine Erklärung für den im Drüsenepithel sehr grossen Gehalt an VDR könnte in der Enterozytendifferenzierung im Darmepithel liegen. So konnte eine Arbeit von Walters und Weiser (1987) am Oberflächenepithel im Darm aufzeigen, dass ausgereifte Enterozyten an der Zottenspitze die grösste Kapazität für den transzellulären Ca-Transport besaßen, allerdings die nur zum Teil differenzierten Enterozyten der basalen bis mittleren Abschnitte der Duodenumzotten am schnellsten auf erhöhtes Calcitriol mittels aktiver Ca-Absorption reagierten. Die Enterozyten an der Zottenspitze seien hingegen zu weit ausdifferenziert um dem Bedarf entsprechend noch zusätzliche Proteine für die Ca-Aufnahme zu synthetisieren (Walters und Weiser,

1987). In einer anderen Studie wiesen Freeman et al. (1995) mittels in situ Hybridisierung die grösste Anzahl der Transkripte für PMCA1 in den sich differenzierenden Enterozyten in den Krypten, in den Kryptenmündungen an der Zottenbasis sowie in den basalen Zottenabschnitten nach. Eine Korrelation der Parameter ist insofern plausibel, als dass sowohl VDR – in der Funktion eines ligand-aktivierten Transkriptionsfaktors – als auch die Ca-Pumpe PMCA1 für die aktive Ca-Resorption essentiell sind.

Das VDR-Verteilungsmuster der beim Kaninchen untersuchten Darmabschnitte entspricht den Erkenntnissen der Studien von Walter und Weiser (1987) sowie von Freeman et al. (1995). Die Drüsenepithelabschnitte mit den sich differenzierenden Enterozyten wiesen einen signifikant stärkeren VDR-Gehalt auf als das Oberflächenepithel. Im Dünndarm lagen im Oberflächenepithel zudem signifikante Unterschiede zwischen den weniger differenzierten Enterozyten in der Kryptenmündung an der Zottenbasis und der ausdifferenzierten Enterozyten an der Zottenspitze vor.

Die kleinste Anzahl VDR und somit die schwächste Immunreaktion wurde im Ileum, dem distalsten Dünndarmabschnitt beobachtet, in welchem gemäss verschiedener Autoren (Kamphues, 1991; Redrobe, 2002; Hoenderop et al., 2005) auch die geringste transzelluläre Ca-Transportaktivität zu erwarten ist.

Der kumulative IRS der VDR des Colons (Mittelwert des kumulativen IRS: 169), dem distalsten untersuchten Darmabschnitt vorliegender Arbeit, war mit einem Faktor von 1,09 nur geringgradig grösser als jener des Ileums (Mittelwert des kumulativen IRS: 155).

Aus den im Rahmen vorliegender Untersuchung erhobenen Daten bezüglich der Verteilung der VDR im Darmepithel von Kaninchen, können folgende Schlüsse gezogen werden:

Die Verteilung der VDR in den untersuchten Darmabschnitten dieser Tierart deutet auf eine sehr grosse transzelluläre Ca-Absorptionaktivität, sowohl in den proximalen Dünndarmabschnitten als auch im Caecum. Im Ileum und im Colon, den beiden distalen Abschnitten des Dünn- bzw. Dickdarmes, wurden die kleinsten VDR-Mengen nachgewiesen, wonach eine transzelluläre Ca-Absorption hier nur in sehr geringem Masse erfolgen dürfte.

Ferner dürfte die Expression der VDR mit der Enterozytendifferenzierung korrelieren, da Zellen in einem früheren Entwicklungsstadium einen grösseren Gehalt an VDR aufwiesen als bereits fortgeschritten differenzierte Zellen.

Zudem schien der Faktor Fütterung mit unterschiedlichen Ca-Gehalten auf die VDR-Expression in den Enterozyten nur einen geringen Einfluss zu haben. So wurden, mit Ausnahme des basalen Drüsenepithels des Caecums, in den verschiedenen Darmabschnitten keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Fütterungsgruppen beobachtet.

Allerdings sollte der Ca-Gehalt in der Kaninchenfütterung dem physiologischen Bedarf der Tiere angepasst werden, um Komplikationen – v. a. Harnsteinbildung – in Folge der effizienten enteralen Ca-Absorption mit der anschliessenden renalen Ausscheidung überschüssigen Calciums entgegenzuwirken.



## 8 Literaturverzeichnis

**Armas, L., Hollis, B. und Heaney, R. (2004):** Vitamin D2 is much less effective than vitamin D3 in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **89**: 5387-5391.

**Barley, N., Howard, A., O'Callaghan, D., Legon, S. und Walters, J. (2000):** Epithelial calcium transporter expression in human duodenum. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal Liver Physiology* **280**: G285-G290.

**Berger, U., Wilson, P., McClelland, R. A., Colston, K., Haussler, M. R., Pike, J. W. und Coombes, C. (1988):** Immunocytochemical detection of 1,25-dihydroxyvitamin D receptors in normal human skin tissues. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **67**: 607-613.

**Berlin, D. und Aroch, I. (2008):** Concentrations of ionized and total magnesium and calcium in healthy horses: Effects of age, pregnancy, lactation, pH and sample type. *The Veterinary Journal* **article in press**.

**Björnhag, G. (1994):** Adaptations in large intestine allowing small animals to eat fibrous foods. In: *The digestive system in mammals*. D. J. Chivers und P. Langer (Hrsg.). New York, Cambridge University Press: 287-309.

**Boos, A., Riner, K., Hässig, M. und Liesegang, A. (2007):** Immunohistochemical demonstration of vitamin D receptor distribution in goat intestines. *Cell Tissues Organs* **186**: 121-128.

**Breves, G., Diener, M., Ehrlein, H. J., von Engelhart, W., Kaske, M., Leonhard-Marek, S., Martens, H., Moller, P. D., Scharrer, E., Schemann, M. und Wolffram, S. (2000):** Physiologie des Magen-Darm-Kanals. In: *Physiologie der Haustiere*. W. von Engelhardt und G. Breves (Hrsg.). Stuttgart, Enke: 402-405.

**Bronner, F. (1987):** Intestinal calcium absorption: mechanism and applications. *Journal of Nutrition* **117**: 1347-1352.

**Bronner, F. (2003):** Mechanism of intestinal calcium absorption. *Journal of Cellular Biochemistry* **88**: 387-393.

**Buss, S. L. und Bourdeau, J. E. (1984):** Calcium balance in laboratory rabbits. *Miner and Electrolyte Metabolism* **10**: 127-132.

**Centeno, V. A., Diaz de Barboza, G. E., Marchionatti, A. M., Alisio, A. E., Dallorso, M. E., Nasif, R. und Tolosa de Talamoni, N. G. (2004):** Dietary calcium deficiency increases Ca<sup>2+</sup> uptake and Ca<sup>2+</sup> extrusion mechanisms in chick enterocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology* **139**: 133-141.

**Chapin, R. und Smith, S. (1967):** Calcium requirement of growing rabbits. *Journal of Animal Science* **26**: 67-71.

**Cheeke, P. R. und Amberg, J. W. (1973):** Comparative calcium excretion by rats and rabbits. *Journal of Animal Science* **37**: 450-454.

**Christakos, S. und Prince, R. (2003):** Estrogen, vitamin D, and calcium transport. *Journal of Bone and Mineral Research* **18**: 1737-1739.

**Clauss, W., Biehler, K. H., Schäfer, H. und Wills, N. K. (1987):** Ion transport and electrophysiology of the early proximal colon of rabbit. *Pflügers Archiv -European Journal of Physiology* **408**: 592-599.

**Clauss, W., Hoffmann, B., Schäfer, H. und Hörnicke, H. (1989):** Ion transport and electrophysiology in rabbit cecum. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal Liver Physiology*: G1090-G1099.

**DeLuca, F. und Holick, F. (1979):** Vitamin D: Biosynthesis, metabolism and mode of action. In: *Endocrinology*. L. DeGroot (Hrsg.). Philadelphia, Saunders: 653-668.

**Dusso, A., Brown, A. und Slatopolsky, E. (2005):** Vitamin D. *American Journal of Physiology: Renal Physiology* **289**: F8-F28.

**Eckermann-Ross, C. (2008):** Hormonal regulation and calcium metabolism in the rabbit. *Veterinary Clinics; Exotic Animal Practice* **11**: 139-152.

**Ewringmann, A. (2005):** Kaninchen. In: *Heimtierkrankheiten*. T. Göbel und A. Ewringmann (Hrsg.). Stuttgart, Eugen Ulmer: 27-67.

**Freeman, T. C., Howard, A., Bentsen, B. S., Legon, S. und Walters, J. R. (1995):** Cellular and regional expression of transcripts of the plasma membrane calcium pump PMCA1 in rabbit intestine. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal Liver Physiology* **32**: G126-G131.

**Fromm, M. und Hierholzer, K. (2000):** Niere. In: *Physiologie der Haussäugetiere*. W. von Engelhardt und G. Breves (Hrsg.). Stuttgart, Enke: 254-288.

**Glisanz, V., Roe, T., Antunes, J., Carlson, M., Leite Duarte, M. und Goodman, W. (1991):** Effect of dietary calcium on bone density in growing rabbits. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism* **260**: E471-E476.

**Goff, J. P., Reinhardt, T. A., Beckman, M. J. und Horst, R. L. (1990):** Contrasting effects of exogenous 1,25-dihydroxyvitamin D [1,25-(OH)<sub>2</sub>D] versus endogenous 1,25-(OH)<sub>2</sub>D, induced by dietary calcium restriction, on vitamin D receptors. *Endocrinology* **126**: 1031-1035.

**Habicht, A. und Watschinger, B. (2001):** Parathormon und Kalzium-Phosphat-Stoffwechselstörungen bei chronischer Niereninsuffizienz. *Journal für Mineralstoffwechsel* **8**: 18-21.

**Harcourt-Brown, F. (2002):** Biological characteristics of the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculi*). In: *Textbook of Rabbit Medicine*. F. Harcourt-Brown (Hrsg.). Kent, Elsevier Science: 1-18.

**Haussler, M. (1986):** Vitamin D receptors: nature and functions. *Annual Reviews: Nutrition* **6**: 527-62.

**Haussler, M., Whithfield, G., Haussler, C., Hsieh, J., Thompson, P., Selznick, S., Dominguez, C. E. und Jurutka, P. (1998):** The nuclear vitamin D receptor: Biological and molecular regulatory properties revealed. *Journal of Bone and Mineral Research* **13**: 325-349.

**Hintz, H. F., Schryver, H. F. und Stevens, C. E. (1978):** Digestion and absorption in the hindgut of nonruminant herbivores. *Journal of Animal Science* **46**: 1803-1807.

**Hoenderop, J., Nilius, B. und Bindels, R. (2005):** Calcium absorption across epithelia. *Physiological Review* **85**: 373-422.

**Hoenderop, J., van der Kemp, A., Hartog, A., van der Graaf, S., Van Os, C., Willems, P. und Bindels, R. (1999):** Molecular identification of the Ca<sup>2+</sup> channel in 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-responsive epithelia. *The Journal of Biological Chemistry* **274**: 8375-8378.

**Horst, R. L., Goff, J. P. und Reinhardt, T. A. (1990):** Advancing age results in reduction of intestinal and bone 1,25-dihydroxyvitamin D receptor. *Endocrinology* **162**: 1053-1057.

**Horst, R. L., Goff, J. P. und Reinhardt, T. A. (2005):** Adapting to the transition between gestation and lactation: Differences between rat, human and dairy cow. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* **10**: 141-156.

**Hrapkiewicz, K., Medina, L. und Holmes, D. D. (1998):** Urolithiasis. In: *Clinical Medicine of Small Mammals and Primates*. K. Hrapkiewicz, L. Medina und D. D. Holmes (Hrsg.). Iowa, Manson Publishing: 135-172.

**Isenbügel, E. und Frank, W. (1985):** Kaninchen. In: *Heimtierkrankheiten*, Ulmer: 48-66

**Jurutka, P., Whitfield, G., Hsieh, J., Thompson, P., Haussler, C. und Haussler, M. (2001):** Molecular nature of the vitamin D receptor and its role in regulation of gene expression. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* **2**: 203-216.

**Kamphues, J. (1991):** Calcium metabolism of rabbits as an etiological factor for urolithiasis. *Journal of Nutrition* **121**: 95-96.

**Kamphues, J., Carstensen, P., Schroeder, D., Meyer, H., Schoon, H. A. und Rosenbruch, M. (1985):** Effekte einer steigenden Calcium- und Vitamin D-Zufuhr auf den Calciumstoffwechsel von Kaninchen. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **56**: 191-208.

**Kaune, R. (1999):** Knochenstoffwechsel. In: *Physiologie der Haussäugetiere*. W. von Engelhardt und G. Breves (Hrsg.). Stuttgart, Enke: 621-625.

**Kimberg, D., Schachter, D. und Schenker, H. (1961):** Active transport of calcium by intestine: Effects of dietary calcium. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism* **200**: 1256-1262.

**Kraft, W., Früll, M., Bostedt, H. und Heinritzi, K. (2005):** Skelettmuskulatur, Knochen, Kalzium-, Phosphor-, Magnesiumstoffwechsel. In: Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin. W. Kraft und U. M. Dürr (Hrsg.). Stuttgart, Schattauer: 266-280.

**Krasowski, M. D., Yasuda, K., Hagey, L. R. und Schuetz, E. G. (2005):** Evolutionary selection across the nuclear hormone receptor superfamily with a focus on the NR1I subfamily (vitamin D, pregnane X, and constitutive androstane receptors). Nuclear Research **3**: 1-20.

**Krück, F. (1988):** Elektrolyt- und Wasser-Haushalt. In: Pathophysiologie: Physiologische und pathophysiologische Grundlagen innerer Erkrankungen. F. Krück (Hrsg.). München, Urban & Schwarzenberg: 539-543.

**Leng, E. (1978):** Absorption of inorganic ions and volatile fatty acids in the rabbit caecum. The British Journal of Nutrition **40**: 509-519.

**Liebich, H. G. (2003):** Verdauungsapparat (apparatus digestorius). In: Funktionelle Histologie der Haussäugetiere. H. G. Liebich (Hrsg.). München, Schattauer: 187-238.

**Liel, Y., Shany, S., Smirnoff, P. und Schwartz, B. (1999):** Estrogen increases 1,25-Dihydroxyvitamin D receptors expression and bioresponse in the rat duodenal mucosa. Endocrinology **140**: 280-285.

**Liesegang, A., Hatt, J. M. und Wanner, M. (2007):** Influence of different dietary calcium levels on the digestibility of Ca, Mg and P in Hermann's tortoises (Testudo hermanni). Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition **91**: 459-464.

**Liesegang, A., Riner, K. und Boos, A. (2007):** Effects of gestation and lactation on Vitamin D receptor amounts in goats and sheep. Domestic Animal Endocrinology **33**: 190-202.

**Mangelsdorf, D., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P. und Evans, R. (1995):** The nuclear receptor superfamily: The second decade. Cell **83**: 835-839.

**Meinecke, B. (1999):** Allgemeine Endokrinologie. In: Physiologie der Haussäugetiere. W. von Engelhardt und G. Breves (Hrsg.). Stuttgart, Enke: 490-497.

**Mosimann, W. und Kohler, T. (1990):** Verdauungsorgane. In: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere. W. Mosimann und T. Kohler (Hrsg.). Hamburg, Verlag Paul Parey: 153-181.

**Nelson, D. und Cox, M. (2001):** Regulation der Genexpression. In: Lehninger Biochemie. D. Nelson und M. Cox (Hrsg.). Berlin, Springer: 1169-1218.

**Nemere, I., Ray, R. und McManus, W. (2000):** Immunohistochemical studies on the putative plasmalemma receptor for 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. I. chick intestine. American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism **278**: 1104-1114.

**Nijenhuis, T., Hoenderop, J., Nilius, B. und Bindels, R. (2003):** (Patho)physiological implications of the novel  $\text{Ca}^{2+}$  channels TRPV5 and TRPV6. *Pflügers Archiv -European Journal of Physiology* **446**: 401-409.

**Noll, S. und Schaub-Kuhnen, S. (2000):** Nachweismethoden. In: *Praxis der Immunhistochemie*. H. Höfer und K. M. Müller (Hrsg.). München, Urban & Fischer: 13-19.

**Norman, A. (2006):** Minireview: Vitamin D receptor: New assignments for an already busy receptor. *Endocrinology* **147**: 5542-5548.

**Norman, A., Ishizuka, S. und Okamura, W. (2001):** Ligands for the vitamin D endocrine system: Different shapes function as agonists and antagonists for genomic and rapid response receptors or as ligand for the plasma vitamin D binding protein. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* **76**: 49-59.

**Norman, A., Nemere, I., Zhou, L. X., Bishop, J., Lowe, K., Maiyar, A., Collins, E., Taoka, T., Sergeev, I. und Farach-Carson, M. (1992):** 1,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D, a steroid hormone that produces biologic effects via both genomic and nongenomic pathways. *Journal of Biochemical Molecular Biology* **41**: 231-240.

**Norman, A., Okamura, W., M., H., Bishop, J., Dormanen, M., Bouillon, R., van Baelen, H., Ridall, A., Daane, E., Khoury, R. und Farach-Carson, M. (1997):** Comparison of 6-s-cis- and 6-s-trans-locked analogs of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> indicates that the 6-s-cis conformation is preferred for rapid nongenomic responses and that neither 6-cis- nor 6-s-trans-locked analogs are preferred for genomic biological responses. *Molecular Endocrinology* **11**: 1518-1531.

**O'Malley, B. (2005):** Rabbits. In: *Clinical anatomy and physiology of exotic species*. B. O'Malley (Hrsg.). Bray, Elsevier Saunders: 173-195.

**Popesko, P. (1989):** Kaninchen. Darmtrakt, Ansicht von rechts. Halbschematisch. In: *Atlas der topographischen Anatomie der Haustiere*. P. Popesko (Hrsg.). Stuttgart, Enke. **II**: 194.

**Redrobe, S. (2002):** Calcium metabolism in rabbits. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* **11**: 94-101.

**Reichrath, J., Classen, U., Meinecke, V., DeLuca, H., Tilgen, W., Kerber, A. und Holick, F. (2000):** Immunoreactivity of six monoclonal antibodies directed against 1,25-dihydroxyvitamin-D<sub>3</sub> in human skin. *The Histochemical Journal* **32**: 625-629.

**Riner, K. (2006):** Immunhistochemische Untersuchungen zur Verteilung von Vitamin D-Rezeptoren im Darm von Schaf und Ziege. *Doktorenwürde*, Universität Zürich.

**Riner, K., Boos, A., Hässig, M. und Liesegang, A. (2008):** Vitamin D receptor distribution in intestines of domesticated sheep *Ovis ammon* f. *aries*. *Journal of Morphology* **269**: 144-152.

**Romeis, B. (1989):** Immunhistochemische Färbemethoden. In: *Mikroskopische Technik*. P. Böck (Hrsg.). München, Urban & Schwarzenberg: 251-262.

**Rougui, Z., Bouizar, Z., Walrant, O. und Rizk-Rabin, M. (1998):** Distinct, tissue-specific regulation of vitamin D receptor in the intestine, kidney and skin by dietary calcium and vitamin D. *Endocrinology* **139**: 1844-1852.

**Salomon, F. V. (2005):** Verdauungsapparat, Apparatus digestorius. In: Anatomie für die Tiermedizin. F. V. Salomon, H. Geyer und U. Gille (Hrsg.). Stuttgart, Enke: 235-323.

**Scharrer, E. und Wolfram, S. (2000):** Funktionen des Dünndarmes und seiner Anhangsdrüsen. In: Physiologie der Haustiere. W. von Engelhardt und G. Breves (Hrsg.). Stuttgart, Enke: 369-394.

**Schley, P. (1985):** Körperbau und Organfunktionen. In: Kaninchen. P. Schley (Hrsg.). Stuttgart, Ulmer: 9-37.

**Schlögl, W. (2003):** Verdauung. In: Das grosse Buch vom Kaninchen. W. Schlögl, DLG Verlag: 206-212.

**Schröder, B. und Breves, G. (2006):** Mechanism and regulation of calcium absorption from the gastrointestinal tract of pigs and ruminants: comparative aspects with special emphasis on hypocalcemia in dairy cows. *Animal Health Research Reviews* **7**: 31-41.

**Schryver, H. F., Hintz, H. F. und Lowe, J. E. (1974):** Calcium and phosphorus in the nutrition of the horse. *The Cornell Veterinarian* **64**: 493-515.

**Schulze, A. (2005):** Besonderheiten der Anatomie der Heimtiere. In: Anatomie für die Tiermedizin. F. V. Salomon, H. Geyer und U. Gille (Hrsg.). Stuttgart, Enke: 718-753.

**Schweigert, F. J. (1999):** Vitamine. In: Physiologie der Haussäugetiere. W. von Engelhardt und G. Breves (Hrsg.). Stuttgart, Enke: 594-605.

**Sellin, J. H. und DeSoignie, R. (1984):** Rabbit proximal colon: A distinct transport epithelium. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal Liver Physiology*: G603-G610.

**Singer, K. (2006):** Ca-Fluxe und Vitamin D-Rezeptoren in verschiedenen Darmabschnitten von Kühen unter Berücksichtigung der Faktoren Alter und Rasse. Doktorenwürde, Universität Zürich.

**Soave, O. und Brand, D. (1991):** Coprophagy in animals: A review. *The Cornell Veterinarian* **81**: 357-364.

**Walters, J., Balesaria, S., Chavele, K. M., Taylor, V., Berry, J. L., Khair, U., Barley, N., van Heel, D. A., Field, J., O Hayat, J., Bhattacharjee, A., Jeffery, R. und Poulson, R. (2006):** Calcium channel TRPV6 expression in human duodenum: Different relationships to the Vitamin D system and age in men and women. *Journal of Bone and Mineral Research* **21**: 1770-1777.

**Walters, J. und Weiser, M. M. (1987):** Calcium transport by rat duodenal villus and crypt basolateral membrane. American Journal of Physiology: Gastrointestinal Liver Physiology **252**: G170-G177.

**Walters, M. R. und Nemere, I. (2004):** Receptors for steroid hormones: Membran-associated and nuclear forms. Cellular and Molecular Life Sciences **61**: 2309-2321.

**Warren, H. B., Laussen, N. C., Segre, G. V. und Brown, E. M. (1989):** Regulation of calciotropic hormones in vivo in the new zealand white rabbit. The Journal of Endocrinology **125**: 2683-2690.

**Weigel, N. und Moor, N. (2007):** Steroid receptor phosphorylation: A key modulator of multiple receptor functions. Journal of the Endocrine Society **17**: e005.

**Weyrauch, K. D., Smollich, A. und Schorr, B. (1998):** Verdauungssystem. In: Histologie-Kurs für Veterinärmediziner. K. D. Weyrauch und A. Smollich (Hrsg.). Stuttgart, Enke: 59-87.

**Zhu, Y., Goff, J. P., Reinhardt, T. A. und Horst, R. L. (1998):** Pregnancy and lactation increase vitamin D-dependent intestinal membrane calcium Adenosin Triphosphatase and calcium protein messenger Ribonucleic Acid expression. Endocrinology **139**: 3520-3524.

## 9 Anhang

### 9.1 Tabellen zu Kapitel 5: Material und Methoden

Tabelle 7: Analyse der Zusammensetzung der vier Futterpellets in % TS sowie J/g TS  
(Labor des Institutes für Tierernährung der Vetsuisse-Fakultät der Universität Zürich)

Rohstoff		L	G	LG	GG
Trockensubstanz	%	90,4	89,5	84,4	90,8
Rohprotein	%	16,4	18,1	14,6	13,5
Rohfett	%	1,9	4,0	3,5	5,1
Rohasche	%	12,4	14,6	8,1	9,1
Rohfaser	%	29,0	19,0	19,1	13,4
NfE	%	40,0	44,1	54,5	58,7
OS	%	85,5	85,3	91,8	90,8
NDF	%	46,3	45,8	38,2	33,3
ADF	%	32,7	23,3	20,9	18,1
ADL	%	8,8	4,1	4,9	3,8
HC	%	13,6	22,5	17,2	15,2
C	%	23,8	19,1	15,9	14,2
HCluA	%	0,46	2,92	0,60	1,74
Bruttoenergie	J/g	17763	17589	18372	18136
Calcium	%	2,32	1,04	1,36	0,83
Phosphor	%	0,28	0,54	0,35	0,46
Magnesium	%	0,21	0,27	0,19	0,25
Ca:P-Verhältnis		8,00	1,91	3,82	1,79

L = Luzerne; G = Gras; LG = Luzerne & Getreide; GG = Grasmehl & Getreide



Tabelle 8: Protokoll der Entwässerung und Infiltration der Gewebeproben mit Paraffin

Dauer	Reagens
4h	70% Alkohol
4h	70% Alkohol
4h	96% Alkohol
4h	96% Alkohol
4h	100% Alkohol
4h	100% Alkohol
4h	Methylbenzoat
4h	Methylbenzoat
4h	Xylol
4h	Xylol
4h	Paraffin
4h	Paraffin

Tabelle 9: Immunhistochemie-Protokoll

Arbeitsgang			Dauer
1.	Waschen in	Xylol	2 x 10 min
		Ethanol 100%	2 x 3 min
		Ethanol 96%	3 min
		Ethanol 70%	3 min
2.	Spülen mit	TBS	2 min
3.	Kochen in	Citratpuffer	3 x 5 min
4.	Abkühlen in	Citratpuffer in Kaltwasserbecken	20 min
5.	Waschen in	3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10 min
6.	Spülen mit	TBS	
		auf Coverplates bringen	
7.	Spülen mit	TBS	3 min
8.	Inkubieren mit	100µl Avidin D- Blockierungslösung	20 min
9.	Spülen mit	TBS	3 min
10.	Inkubieren mit	100µl Biotin-Blockierungslösung	20 min
11.	Spülen mit	TBS	3 min
12.	Inkubieren mit	100µl Protein- Block Serum-free	10 min
13.	Spülen mit	TBS	3 min
14.	Inkubieren mit	100µl biotinmarkiertem Ak 9A7γ (Verdünnung 1:50)	80 min
15.	Spülen mit	TBS	3 min
16.	Inkubieren mit	StreptABComplex/HRP	30 min
17.	Spülen mit	TBS	3 min
18.	Entwickeln mit	DAB	5 min
19.	Spülen mit	TBS	3 min
20.	Kernfärben mit	Hämalaun	10 min
21.	Bläuen unter fließendem Wasser		
22.	Waschen in	70 % Ethanol	reindippen
		96% Ethanol	reindippen
		100% Ethanol	2 min
		Xylol	5 min
23.	Eindecken mit Pertex®		

TBS = Tris gepufferte NaCl-Lösung; pH = 7,6; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = Wasserstoffperoxid;  
DAB = Chromogen 3,3'Diaminodenzidin

## 9.2 Tabellen zu Kapitel 6: Resultate

Tabelle 10: Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (STD) der VDR-IRS der einzelnen Darmabschnitte der untersuchten Kaninchen 1-1 bis 4-6

	Duodenum	Jejunum	Ileum	Cäcum	Colon
<b>Gruppe L</b>					
Tier 1-1	816	570	80	1096	23
Tier 1-2	685	332	158	1145	382
Tier 1-3	957	327	70	620	38
Tier 1-4	763	425	358	748	302
Tier 1-5	793	581	173	820	633
Tier 1-6	489	359	141	628	328
Summe	4501	2595	979	5058	1706
STD	156	116	104	228	229
<b>MW</b>	<b>750</b>	<b>432</b>	<b>163</b>	<b>843</b>	<b>284</b>
<b>Gruppe G</b>					
Tier 2-1	265	192	128	1027	255
Tier 2-2	190	145	76	861	234
Tier 2-3	672	144	76	892	207
Tier 2-4	863	455	188	1027	121
Tier 2-5	738	584	279	973	538
Tier 2-6	199	94	51	553	43
Summe	2928	1614	798	5333	1397
STD	303	201	87	178	169
<b>MW</b>	<b>488</b>	<b>269</b>	<b>133</b>	<b>889</b>	<b>233</b>
<b>Gruppe LG</b>					
Tier 3-1	628	372	185	1130	44
Tier 3-2	481	368	90	874	0
Tier 3-3	98	85	75	1171	9
Tier 3-4	739	216	177	1020	37
Tier 3-5	668	646	600	1275	501
Tier 3-6	463	157	97	881	80
Summe	3076	1844	1224	6352	670
STD	230	202	200	162	193
<b>MW</b>	<b>513</b>	<b>307</b>	<b>204</b>	<b>1059</b>	<b>112</b>
<b>Gruppe GG</b>					
Tier 4-1	634	205	134	829	38
Tier 4-2	552	178	76	806	0
Tier 4-3	384	378	68	569	105
Tier 4-4	556	294	84	892	23
Tier 4-5	409	392	249	187	24
Tier 4-6	592	436	105	695	92
Summe	3127	1883	716	3977	282
STD	101	106	68	260	42
<b>MW</b>	<b>521</b>	<b>314</b>	<b>119</b>	<b>663</b>	<b>47</b>

L: Fütterungsgruppe 'Luzerne'; G: Fütterungsgruppe 'Gras'; LG: Fütterungsgruppe 'Luzerne & Getreide'; GG: Fütterungsgruppe 'Grasmehl & Getreide'

Tabelle 11: Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (STD) des VDR-IRS der einzelnen Darmabschnitte und deren ausgewerteten Epithelabschnitte.

	Gruppe L	Gruppe G	Gruppe LG	Gruppe GG	STD	MW
<b>Duodenum</b>						
Du DrEp	1406	851	1022	1032	234	<b>1078</b>
Du ObEp basal	622	421	394	424	105	<b>465</b>
Du ObEp apikal	223	193	123	108	55	<b>162</b>
Summe	2251	1465	1539	1564		<b>1705</b>
STD	602	334	461	470		<b>467</b>
<b>MW</b>	<b>750</b>	<b>488</b>	<b>513</b>	<b>521</b>	132	<b>568</b>
<b>Jejunum</b>						
Je DrEp	850	462	569	578	165	<b>615</b>
Je ObEp basal	343	260	257	276	40	<b>284</b>
Je ObEp apikal	105	85	96	87	9	<b>93</b>
Summe	1298	807	922	941		<b>992</b>
STD	381	189	240	248		<b>264</b>
<b>MW</b>	<b>433</b>	<b>269</b>	<b>307</b>	<b>314</b>	71	<b>331</b>
<b>Ileum</b>						
Il DrEp	235	183	311	175	63	<b>226</b>
Il ObEp basal	158	119	184	102	37	<b>141</b>
Il ObEp apikal	98	97	118	81	15	<b>99</b>
Summe	491	399	613	358		<b>465</b>
STD	69	45	98	49		<b>65</b>
<b>MW</b>	<b>164</b>	<b>133</b>	<b>204</b>	<b>119</b>	38	<b>155</b>
<b>Caecum</b>						
Cae DrEp basal	1277	1323	1560	1041	213	<b>1300</b>
Cae DrEp apikal	964	1133	1263	810	198	<b>1043</b>
Cae ObEp	288	211	353	137	94	<b>247</b>
Summe	2529	2667	3176	1988		<b>2590</b>
STD	506	595	629	470		<b>549</b>
<b>MW</b>	<b>843</b>	<b>889</b>	<b>1059</b>	<b>663</b>	163	<b>863</b>
<b>Colon</b>						
Co DrEp basal	406	248	129	56	153	<b>210</b>
Co DrEp apikal	356	393	168	49	162	<b>242</b>
Co ObEp	91	58	38	36	26	<b>56</b>
Summe	853	699	335	141		<b>507</b>
STD	169	168	67	10		<b>99</b>
<b>MW</b>	<b>284</b>	<b>233</b>	<b>112</b>	<b>47</b>	109	<b>169</b>

Du = Duodenum; Je = Jejunum; Il = Ileum; Cae = Caecum; Co = Colon; DrEp = Drüsenepithel;  
ObEp = Oberflächenepithel

Tabelle 12: Verhältnis der kumulativen IRS zwischen den einzelnen Darmabschnitten (IRS Darmabschnitt 1 : IRS Darmabschnitt 2)

Darmabschnitte	L	G	LG	GG
Cae : Du	1,124	1,820	2,064	1,271
Cae : Je	1,948	3,305	3,445	2,113
Cae : Il	5,151	6,684	5,181	5,553
Cae : Co	2,965	3,815	9,481	14,099
Du : Je	1,734	1,815	1,669	1,662
Du : Il	4,585	3,672	2,511	4,369
Du : Co	2,639	2,096	4,594	11,092
Je : Il	2,644	2,023	1,504	2,628
Je : Co	1,522	1,155	2,752	6,674
Il : Co	0,576	0,571	1,830	2,539

L: Fütterungsgruppe 'Luzerne'; G: Fütterungsgruppe 'Gras'; LG: Fütterungsgruppe 'Luzerne & Getreide'; GG: Fütterungsgruppe 'Grasmehl & Getreide'; Du= Duodenum; Je = Jejunum; Il = Ileum; Cae = Caecum; Co = Colon

## **Danksagung**

An dieser Stelle bedanke ich mich herzlichst bei allen Personen, die mir die Realisierung dieser Arbeit ermöglicht haben, insbesondere bei:

Herrn Prof. Dr. A. Boos für die Überlassung des Themas, die Übernahme des Referats sowie für die gute fachliche Betreuung während der ganzen Doktorandenzeit.

Frau PD Dr. A. Liesegang für die Übernahme des Koreferates und der statistischen Auswertung sowie für die genaue Korrektur.

Frau J. Leclerc für die grosszügige und kompetente Unterstützung bei der Durchführung der immunhistochemischen Analysen sowie für die guten Momente im Labor.

Frau Dr. C. Führer für die sorgfältige Durchsicht der Arbeit.

Dem ganzen Anatomierteam für die tolle Unterstützung sowie für die gute Stimmung am Institut.

Meiner Mutter für das Ermöglichen meines Berufswunsches und meiner Familie und meinen Freunden für den unschätzbaren Rückhalt während des Studiums und der Doktorandenzeit.

## **Curriculum Vitae**

Thérèse de Vries de Heekelingen, geboren am 9. Februar 1980, aus Zürich ZH und Lechelles FR

- 1987-1993 Primarschule, Zürich ZH
- 1993-1995 Sekundarschule, Zürich ZH
- 1995-2000 Gymnasium an der Kantonsschule Stadelhofen, Zürich ZH
- 2000-2006 Studium der Veterinärmedizin an der Vetsuisse-Fakultät Universität  
Zürich ZH
- 2007-2008 Doktorandin am Veterinär-Anatomischen Institut der Vetsuisse-Fakultät  
Universität Zürich ZH
- seit 2008 Assistentin in der Gemischtpraxis von Dr. med. vet. F. Cloux-Fey, La  
Sarraz VD

Zürich, 15. September 2008